

Glycosidasen-vermittelte Glycosidsynthesen

Juan M. Juárez Ruiz

Glycosidasen-vermittelte Glycosidsynthesen

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation
vorgelegt von
MSc Juan Manuel Juárez Ruiz
aus Puebla, Mexiko

Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. W.-D. Fessner

Mitberichterstatter: Universitätsprofessor Dr. H.J. Lindner

Tag der Einreichung: 07.01.02

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.02

Darmstadt 2002

Für Nidia

Herrn Prof. Dr. W.-D. Fessner danke ich herzlich für die reizvolle Themenstellung und sein großes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Der Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT) México danke ich für das Stipendium. *Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT) México agradezco por la beca de estudios.*

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht:

Juárez Ruiz, J.M.; Osswald, G.; Petersen, M.; Fessner, W.-D. »The "Natural Strategy" for the glycosidase-assisted synthesis of simple glycosides« *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11* (4-6), 189-197.

Herrn Prof. Dr. H.J. Lindner danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Für die Aufnahme der NMR-Spektren bedanke ich mich bei Frau K. Jungk und Herrn K.-O. Runzheimer sowie Herrn Dr. S. Braun.

Frau C. Rudolph und Herrn Prof. Dr. J.J. Veith danke ich für die Aufnahme der Massenspektren.

Herrn Dr. Mathias Warwel, Herrn Peter Grundmann, Herrn Jürgen Schooren, Herrn Ingo Riemann und Herrn Maik Dröscher danke ich für die Korrektur des Manuskriptes.

Meiner Familie danke ich für ihre konstante Unterstützung. *A mi familia le agradezco su constante apoyo.*

Besonderer Dank gilt meiner Frau N. Juárez für ihr Verständnis und ihre Geduld sowie ihre liebevolle Unterstützung. *Especial agradecimiento es para mi esposa N. de Juárez por su comprensión y paciencia así como su constante apoyo.*

Schließlich möchte ich mich bei allen Kollegen im Arbeitskreis für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei meinen Laborkollegen Frau Nga Phung, Herrn Dr. Virgil Hélaine und Herrn Achim Porzelle.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
I. Einleitung	1
1. Kohlenhydrate und ihre biologischen Funktionen	1
2. Einfache Glycoside und ihre Bedeutung	4
3. Glycosidsynthese	6
4. Glycosidierung oder Transglycosylierung	8
4.1. Chemische Verfahren	9
4.1.1. Transglycosylierung	9
4.1.2. Die <i>Fischer-Glycosidierung</i>	12
4.1.3. Nukleophile aromatische Glycosidierung	12
4.2. Enzymatische Verfahren	13
4.2.1. Katalytische Transglycosylierung mit Glycosyltransferasen	13
4.2.2. Katalytische Hydrolyse von Sacchariden mit Glycosidasen	14
4.2.3. Glycosidase-katalysierte Glycosidierung zur Umkehr-Hydrolyse	17
4.2.4. Katalytische Transglycosylierung mit Glycosidasen	20
5. Mechanistische Aspekte	26
5.1. Nicht-enzymatische Hydrolyse von einfachen Glycosiden	26
5.2. Hydrolyse von Glycosiden mittels Glycosidasen	28

II. Zielsetzung	30
III. Allgemeiner Teil	33
1. Synthese von einfachen Glycosiden	33
1.1. Acetalisierung nach der <i>Fischer-Synthese</i>	34
1.1.1. Acetalisierung von Hexosen	34
1.1.2. Acetalisierung von Pentosen	37
1.1.3. Acetalisierung von <i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin	38
1.1.4. Acetalisierung von L-Fucose	39
2.1. Enzymatische partielle Hydrolyse	40
2.1.0. Enzymatische partielle Hydrolyse von α,β -Allyl-D-glucosiden	40
2.1.1. Enzymatische partielle Hydrolyse von α,β -Pent-4-enyl-D-glucosiden	45
2.1.2. Enzymatische partielle Hydrolyse von α,β -Benzyl-D-glucosiden	46
2.1.3. Einfache Reinigung des β -D-Glucosids mittels RP-Chromatographie	47
2.1.4. Partielle Hydrolyse von α,β -Allyl-D-galactosiden	49
2.1.5. Partielle Hydrolyse von α,β -Pent-4-enyl- und α,β -Benzyl-D-galactosiden	51
2.1.6. Partielle Hydrolyse mit roher β -Galactosidase	51
2.1.7. Partielle Hydrolyse von α,β -L-Arabinosiden	52
2.1.8. Partielle Hydrolyse von α,β -D-Xylosiden	53
2.1.9. Partielle Hydrolyse von α,β -D-Glucosiden	54
2.1.10. Partielle Hydrolyse von <i>N</i> -Acetyl- α,β -D-glucosaminosiden	56
2.1.11. Weitere Versuche mit rohen Glycosidasen	57
3.1. Synthese von α -Ethyl-D-glucopyranosid	58
3.1.1. Acetalisierung von D-Glucose mit Ethanol	59
3.1.2. Partielle Hydrolyse von α,β -Ethyl-D-glucosiden	60

4.1 Synthese von β -Docosyl-D-glucopyranosid	64
4.1.1. Acetalisierung von D-Glucose mit 1-Docosanol	65
4.1.2. Enzymatische partielle Hydrolyse von α,β -Docosyl-D-glucosiden	65
5.1 Synthese von einfachen Nitrophenylglycosiden	65
5.1.1. Arylierung von β -D-Glucose	66
5.1.2. Arylierung von α -D-Glucose	68
5.1.3. Arylierung von D-Galactose	68
5.1.4. Arylierung von Pentose	69
5.1.5. Arylierung von <i>N</i> -Acetyl-D-glucosaminosid	69
6. Synthese des Disaccharids β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Xyl	70
6.1. Einleitung	70
6.2. Transglycosylierung	72
6.3. Vergleich der Aktivierung von NPG gegenüber Lactose	75
6.4. Recycling der β -Galactosidase	77
6.5. Ausblick	80
IV. Zusammenfassung	82
V. Experimenteller Teil	88
1. Geräte und Reagenzien	88
2. Allgemeine Arbeitsvorschriften	91
3. Synthesen	94
VI. Literatur	129

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>A. oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Ac	Acetyl
Abb.	Abbildung
Bn	Benzyl-Rest
Bz	Benzoyl-Rest
COSY	Korrelations-Spektroskopie
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett (Spektrenzuordnung)
d	Tag (e)
dd	Dublett-Dublett (Spektrenzuordnung)
ddd	Dublett-Dublett-Dublett (Spektrenzuordnung)
dddd	Dublett-Dublett-Dublett-Dublett (Spektrenzuordnung)
DC	Dünnschichtchromatographie
DME	Dimethylglycol
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMPU	1,3-Dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2-(1H)-pyrimidinon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNFB	2,4-Dinitrophenylfluorbenzen
DNP	2,4-Dinitrophenyl
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI	Elektrosprayionisation (Massenspektrometrie)
Et	Ethyl
Gal	D-Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin

Glc	D-Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin
h	Stunde (n)
HMPA	Hexamethylphosphortriamid
HPLC	Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie
<i>J</i>	Kopplungskonstante
kDa	Kilodalton
M	mol/l
m	Multiplett (Spektrenzuordnung)
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse/Ladungszahl
Me	Methyl
MW	Molekulargewicht
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NIS	<i>N</i> -Iodsuccinimid
NMR	kernmagnetische Resonanz
NPG	Nitrophenyl-D-glycopyranosid
Ph	Phenyl
ppm	Parts per million (NMR-Spektroskopie)
<i>R_f</i>	Rückhaltefaktor (Dünnschichtchromatographie)
RP	Reversed Phase
U	Unit (1 Unit = 1 µmol Umsatz/min)
UVB	Ultraviolette Strahlung B
v:v	Volumenanteil
Xyl	D-Xylose

I. Einleitung

1. Kohlenhydrate und ihre biologischen Funktionen

Kohlenhydrate kommen in allen Lebewesen vor, die Masse der Kohlenhydrate hat eine vergleichsweise triviale biologische Bedeutung: Kohlenhydrate dienen sowohl Einzellern als auch höheren Organismen als mechanisch stabile Stütz- und Gerüstelemente und sind somit verantwortlich für eine optimale Statik der Lebewesen. Bei Wirbeltieren sorgen sie mit für reibungslose Bewegungsabläufe und Stoßabsorption z.B. in Sehnen und Knorpel. Kohlenhydrate sind eine leicht mobilisierbare C-Reserve für den höheren Organismus und damit eine Quelle zur Energiegewinnung und zur Umwandlung in Verbindungen anderer Naturstoffklassen, zum Beispiel in Lipide, Nukleinsäuren und Proteine, die zusammen mit Kohlenhydraten die Grundlage lebender Organismen bilden. Der Informationsgehalt der Kohlenhydrate ist potentiell weit größer als der von Aminosäuren. Letztere tragen neben der Seitenkette nur zwei funktionelle Gruppen, die bei Verknüpfung von Monomeren zudem in der Peptidbindung verschwinden, so dass für Wechselwirkungen nach außen weitgehend nur die jeweiligen Seitenkettenfunktionalitäten zur Verfügung stehen. Im Vergleich dazu haben Monosaccharide drei oder vier vergleichbar reaktive Hydroxygruppen. Die Information in einem Oligosaccharid hängt deshalb nicht nur von der Sequenz der Monosaccharide ab, sondern auch vom Regio- und Anomerentyp der glycosidischen Bindung, die sie verknüpfen. Drei verschiedene Aminosäuren bilden zum Beispiel nur sechs Tripeptide, während ein Trisaccharid in 1056 Strukturen (nur die Pyranosen gerechnet!) vorkommen kann.^[1-3] Bei Säugern gibt es in der Regel acht auftretende Monosaccharid-Bausteine (**Abb. I.1**). Diese wiederum können Mono-, Oligo- oder Polysaccharide bilden. Einen großen Einfluss haben Kohlenhydrate auf die Konformation, Löslichkeit und Stabilität von Glycokonjugaten, wenn

sie kovalent mit Proteinen und Lipiden verknüpft sind. Glycoproteine sind mit Kohlenhydraten modifizierte Proteine, wobei der Kohlenhydratanteil zwischen einem und 80 Prozent liegt. Glycoproteine kommen in allen Lebewesen (Pro- und Eukaryoten) vor und haben die unterschiedlichsten Funktionen, die vielfach auf spezifische Wechselwirkungen mit den zuckerhaltigen Molekülanteilen zurückzuführen sind. Die Glycoproteine helfen bei der Ordnung, Orientierung und Verankerung von Zellen zur Ausbildung spezifischer Gewebe im Lauf der Entwicklung und Regeneration. Die Glycosylierung kann für Transport- und Trägerproteine eine Art Richtungsweiser und Adressenaufkleber sein; sie kann aber auch dazu führen, dass sich Viren, Bakterien und Parasiten den Erkennungsprozessen entziehen. Dies gilt für Glycoproteine aus Pflanzen und Tieren gleichermaßen, jedoch sind letztere bisher sehr viel gründlicher untersucht, da sie unserer Selbsterkenntnis und dem praktischen Zweck der Gesundheitsfürsorge näher liegen als pflanzliche Glycoproteine.^[4-6]

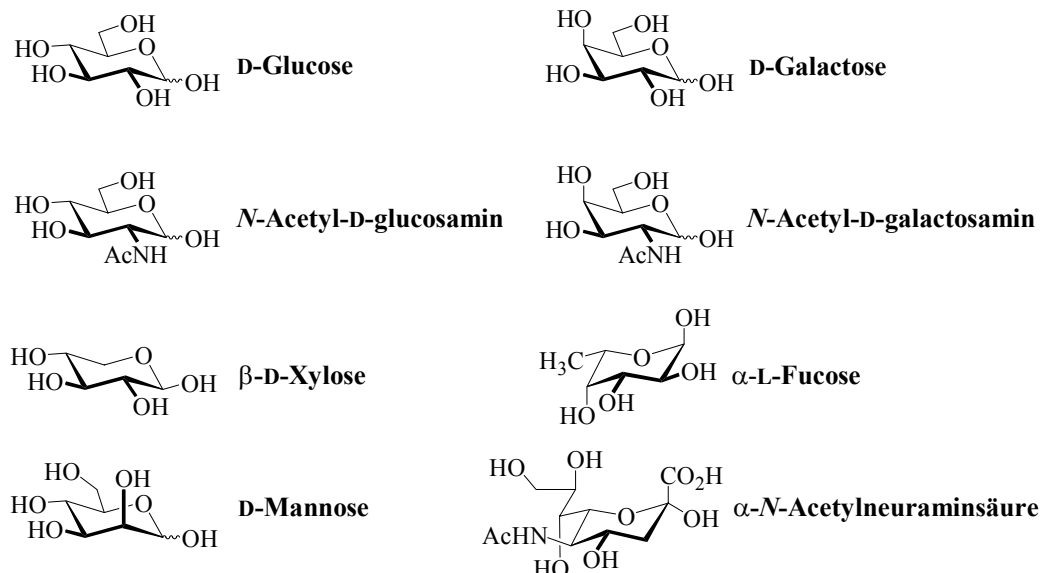


Abb. I.1 In Eukaryoten häufig auftretende Monosaccharide und ihre anomeren Vorzugskonfigurationen in Glykokonjugaten.

Proteoglycane sind eine Unterklasse der Glycoproteine, in denen die Kohlenhydrat-Reste Aminosucker-enthaltende Polysaccharide sind. Diese Polysaccharide werden

Glycosaminoglycane genant. Proteoglycane haben ein zentrales Core-Protein, an dem verschiedenen Polysaccharide kovalent befestigt sind. Protein sowie Zahl und Art der Polysaccharide sind von Fall zu Fall verschieden. Das Core-Protein verfügt über eine Region, die, zusätzlich noch vermittelt durch Bindeproteine, an ein weiteres Glycosaminoglycan, die *Hyaluronsäure*, nicht kovalent binden kann. Die Hyaluronsäure ist das größte Glycosaminoglycan und vermag bis zu 100 Proteoglycane zu einem Komplex von riesigen Ausmaßen anzulagern. Das Tetrasaccharid GlcA(β1,3)-Gal-(β1,3)-Gal-(β1,4)-Xyl kommt in Proteoglycanen in verschiedenen Säugerzellen vor, und zwar als Verbindungsglied zwischen dem Core-Protein und dem Polysaccharidteil (Glycosaminoglycan) **Abb. I.2**. Verschiedene Proteoglycane haben dasselbe Saccharid gemein, in dem die Einheit **A** entweder Serin oder Threonin sein kann und die Einheit **G** entweder GlcNAc oder GalNAc. Vermutlich wird spezifisch bei der biokatalytischen Synthese mittels Enzymen durch die unterschiedliche Verknüpfung mit Glucosaminoglycan (Heparin) oder Galactosaminoglycan (Dermatansulfat oder Chondroitinsulfat) die biologische Funktion gesteuert.^[7-8] Über die Biosynthese der Proteoglycane besteht keine vollständige Klarheit, sie kann durch die enzymatische Transglycosylierung eines Xylosid-Restes mit dem Core-Protein gestartet werden. Man hat herausgefunden, dass die Oligosaccharide Gal-β-(1,4)-Xyl oder Gal-β-(1,3)-Gal-β-(1,4)-Xyl aufgebaut werden, wenn ein β-Aryl-D-xylosid und markierte Galactose in kultivierte Zellen inkubiert werden.^[9-12]

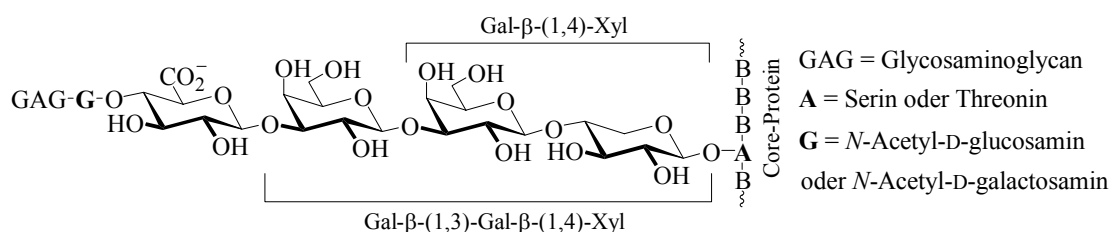
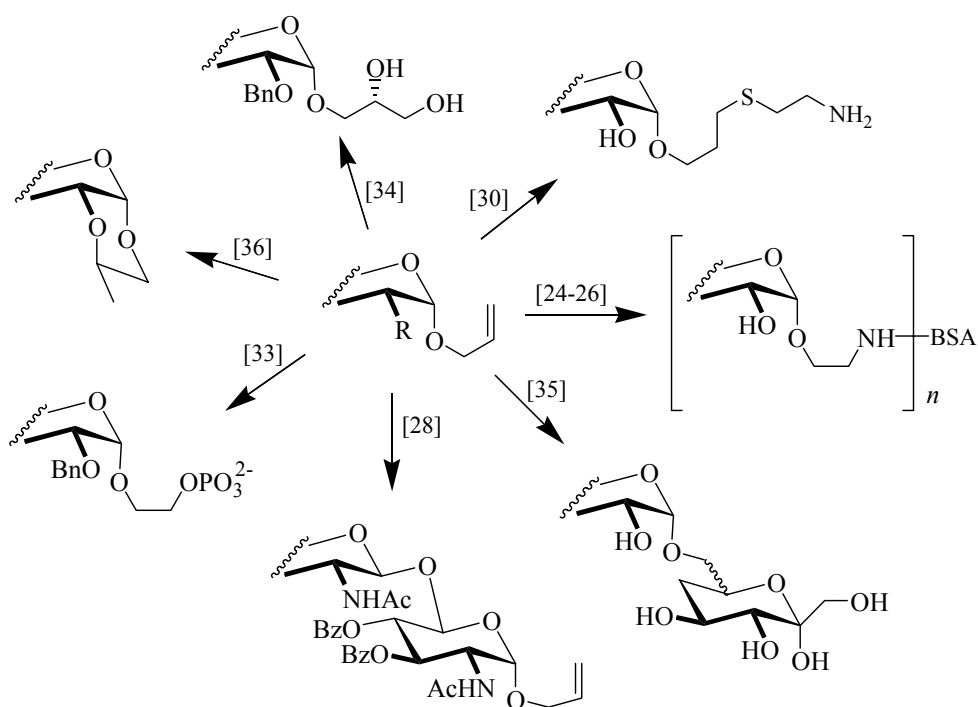


Abb. I.2 Verbindendes Tetrasaccharid bei verschiedenen Glycokonjugaten.

Krankheiten wie z.B. rheumatische Arthritis oder bestimmte bösartige Gewebewucherungen können die Konsequenzen einer Variation im Verknüpfungsmuster des Proteoglycans sein.^[13]

2. Einfache Glycoside und ihre Bedeutung

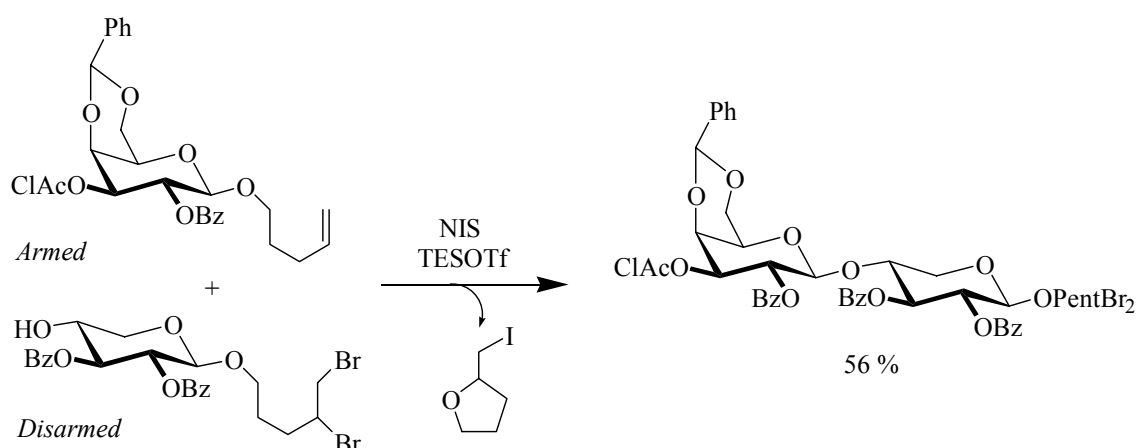
Einfache Glycopyranoside mit spezifischen anomeren Schutzgruppen dienen sowohl als aktivierte Verbindungen für die Oligosaccharidsynthese als auch als chirale Bausteine für die asymmetrische Synthese.^[14-23] Eine Besonderheit stellt die Allyl-Gruppe am anomeren Zentrum dar. Einerseits ist sie eine Verknüpfungseinheit bei der Herstellung von Glycokonjugaten,^[24-26] andererseits eine temporäre Schutzgruppe, die mühelos z.B. durch Isomerisierung zur Propen-1-yl-gruppe abgespalten und in der Synthese von Oligosacchariden verwendet werden kann.^[27-28] Außerdem führen stereoselektive chemische Modifizierungen am Alken zu funktional interessanten Derivaten.^[29-38]



R = OH, OBn, NHAc

BSA = *bovine serum albumin*

Ähnlich wichtig wie die Allyl- ist die Pent-4-enylgruppe, deren Glycoside nach Fraser-Reid über die *Armed-Disarmed-Strategie* für die Glycosid- und Oligosaccharid-Synthese verwendet werden.^[39-43] Ein Beispiel ist die Synthese des Disaccharids Gal- β -(1 \rightarrow 4)- β -Xyl-PentBr₂, bei der selektiv das β -Pent-4-enyl-D-galactosid unter milden Bedingungen mit NIS/TESOTf aktiviert wird.^[42]



Die Benzyl-Gruppe ist eine weitere wichtige anomere Schutzfunktion, die man selektiv unter milden Bedingungen abspalten kann.^[44] Arylglycoside werden vielfach als Glycosid-Überträger für die Glycosid- und Oligosaccharidsynthese verwendet. Eine Besonderheit sind die Nitrophenyl-D-glycoside (NPG), deren hohe Reaktivität sie für enzymatische Transglycosylierungen mit Glycosidasen prädestiniert.^[45-52] Einige einfache Glycopyranoside mit spezifischer Stereochemie besitzen eine überraschende biologische Aktivität wie z.B. das α -Ethyl-D-glucosid, das *in vitro* die Keratinisierung in kultivierten Zellen fördert und *in vivo* den transepidermalen Wasserverlust der ungeschützten Epidermis durch ultraviolette Strahlungen (UVB) reduziert. Das β -Anomer zeigt dagegen fast keine Wirkung.^[53] Aus Pflanzen der Gattung *Solanum* werden verschiedene Steroidglycoside isoliert, die sich durch eine wertvolle antivirale Aktivität gegen Herpes (HSV-1) auszeichnen.^[54]

3. Glycosidsynthese

Gegen Ende des 19. Jahrhunderts wurden zwei Herstellungswege für die Glycosidsynthese etabliert: Die Glycosidierung nach *E. Fischer* sowie die Transglycosylierung nach *Koenigs-Knorr*. Ausgehend von einer freien Glycose werden durch die *Fischer-Glycosidierung* in einem Reaktionsschritt einfache Glycoside als α - und β -Glycosidgemische gewonnen. Die Reaktion wird durch Säure katalysiert und ist auf flüssige Alkohole beschränkt.^[55] Von wenig stabilen Glycosylhalogeniden ausgehend wurden stereoselektiv durch die *Koenigs-Knorr-Reaktion* Alkylglycoside, Arylglycoside, und später Oligosaccharide zugänglich. Zur Entwicklung von Bedingungen für eine hochselektive Reaktionsführung zur α - oder β -Glycosylierung müssen zahlreiche Parameter berücksichtigt werden; generell ist für diese Route der Oligosaccharidsynthese eine Vielzahl von zeitaufwendigen Reaktionsschritten zur Einführung eines passenden Schutzgruppenmusters in beide Reaktionskomponenten notwendig.^[56-58] Dennoch werden diese Verfahren heute immer noch häufig angewandt.^[20] Während im 20. Jahrhundert zunehmend neue saure Lewis-Katalysatoren für beide Umwandlungen erschlossen wurden, fanden Biokatalysatoren in der Kohlenhydratsynthese anfangs nur zögerliche Verwendung. Zwei Enzymklassen finden heute in der Glycosidsynthese vornehmlich Verwendung, nämlich die Glycosidasen (Glycosid-Hydrolasen) und die Glycosyltransferasen.^[59-61] In natürlichen biochemischen Prozessen hydrolysieren die Glycosidasen spezifisch glycosidische Bindungen. *In vitro* können die Glycosidasen nach verschiedenen Verfahrensvarianten in Sinne der Rückreaktion für die Glycosid- und Oligosaccharidsynthese benutzt werden. Beispielsweise sind ausgehend von freien Glycosen und einem Alkylalkohol (oder Zucker) als Glycosylakzeptor einfache Alkylglycoside (oder Oligosaccharide) durch Umkehr-Hydrolyse und aus aktivierten Zuckern durch Transglycosylierung herstellbar. Als aktivierte Zucker (Glycosyl-Donor) finden oft Nitrophenylglycoside, aber auch Oligosaccharide und selten Glycosyl-Fluoride Verwendung.

Glycosidasen wirken hoch spezifisch am anomeren Zentrum, sie sind hoch stereoselektiv und dadurch können α - oder β -Verknüpfungen einheitlich erzielt werden. Glycosidasen sind dennoch leider wenig regioselektiv, wodurch meist mehrere unerwünschte Nebenprodukte entstehen, die in der Praxis ein schwer trennbares Oligosaccharidgemisch bilden. Des weiteren findet wegen der hydrolytischen Funktion der Glycosidasen parallel auch die Hydrolyse als eine Konkurrenzreaktion statt, die nicht vermieden werden kann. Eine Mindestkonzentration Wasser ist in der Reaktion unabdingbar, da ohne dieses das Enzym denaturiert wird und das Substrat nicht ausreichend löslich ist. Die Glycosyltransferasen bilden dagegen spezifisch glycosidische Bindung mit hoher Stereo- und Regioselektivität. Glycosylreste werden *in vivo*, in Säugertierzellmembranen, mit Hilfe von Nucleotiden zum Glycosylakzeptor aktiviert und mittels Glycosyltransferasen transglycosyliert. Im Labor werden diese oft für die Oligosaccharidsynthese und seltener für einfache Glycosidsynthesen im Milligramm-Maßstab verwendet. Als Glycosyldonor dienen dabei nucleosidmono- und -diphosphataktivierte Glycoside. Die Methode der Transglycosylierung mit Glycosyltransferasen leidet jedoch unter der Problematik, daß weder die Enzyme noch die instabilen Glycosyldonoren preiswert erhältlich sind.^[59,62-64]

Aus den in dieser kurzen Rückschau erwähnten Fakten kann man feststellen, dass sowohl die Synthesen einfacher Glycoside als auch die von Oligosacchariden nicht trivial sind. So wird beispielsweise die schon recht betagte und aufwendige *Koenigs-Knorr-Transglycosylierung* noch immer bis in den technischen Maßstab hinein genutzt.^[18,20] Enzymatische Reaktionen fanden erst in den letzten Jahren vermehrt Eingang in die Kohlenhydratsynthese. Sie sind bislang allerdings noch nicht zur Routine entwickelt und mit zahlreichen Problemen behaftet, was weitere Entwicklungsarbeit erforderlich macht. Daher erscheint eine erschöpfende Überprüfung der einfachen Glycosidsynthese bzw. der Oligosaccharidsynthese vernünftig.

4. Glycosidierung oder Transglycosylierung

Durch Substitution am anomeren C-Atom von Zuckereinheiten über eine cyclische Carboxonium-Ion-Zwischenstufe werden α - oder β -Anomere hergestellt (s.u. **Abb. I.3**). Diese Reaktion wird in der Literatur auf verschiedene Art benannt, wie beispielsweise Glycosylierung, Glycosidierung, Transglycosylierung oder Transglycosidierung. In der vorliegenden Dissertation wird die enzymatische oder chemische Substitution als Glycosidierung und Transglycosylierung bezeichnet. Eine konkrete Reaktion wird Glycosidierung genannt, wenn das anomere Zentrum der reaktiven Zuckereinheit frei ist (AG = OH). Es handelt sich um eine Transglycosylierung, wenn in der reaktiven Zuckereinheit ein Aglycon (AG \neq OH) vorliegt. Einfache Glycoside oder Oligosaccharide sind durch beide Verfahren zugänglich. Häufig wird die reaktive Zuckereinheit als Donor, oder Substrat, und die Verbindung ROH als Akzeptor bezeichnet.

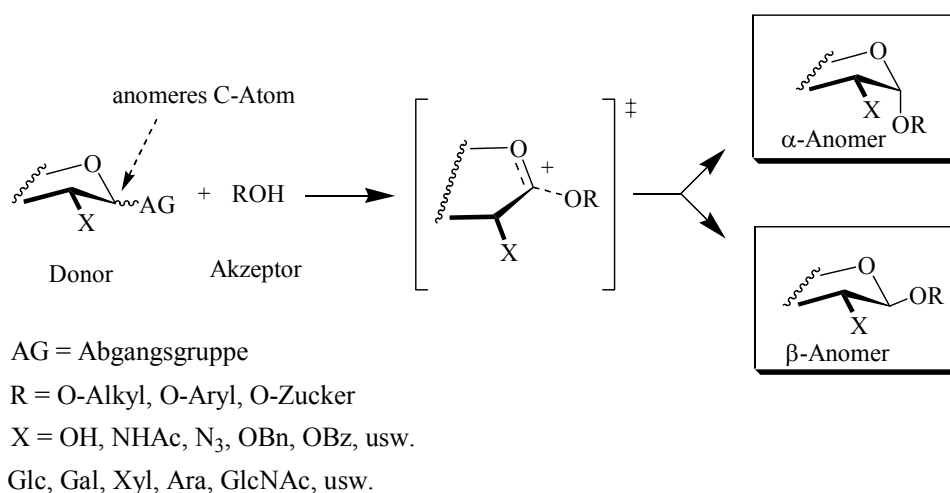


Abb. I.3 Bildung von α - oder β -Anomeren durch Substitution am anomeren C-Atom einer Zuckereinheit.

4.1. Chemische Verfahren

4.1.1. Transglycosylierung

Im Jahre 1879 veröffentlichte *A. Michael* eine erste Glycosidsynthese. Hierbei wurde Phenyl- β -D-glucosid durch eine Transglycosylierung von Tetraacetyl- α -D-glucosylchlorid mit wässrigem Kaliumphenoxid gebildet.^[65] Weitere Alkyl- oder Arylglycoside wurden seit 1901 mit der Methode nach *Koenigs-Knorr* hergestellt. Tetraacetyl- α -D-glucosylbromid wurde mit Alkylalkohol oder Phenol in Gegenwart von Silbercarbonat oder Silbernitrat als saurer Katalysator transglycosyliert.^[56] Eine Verbesserung der Reaktion gelang 1981 nach der *A. Michael-Methode*. β -NPG konnten jetzt mit Ausbeuten von 58-73% erhalten werden, wenn die Glycosylhalogenide mit Nitrophenolen in Gegenwart von ungiftigem Tetrabutylammoniumbromid transglycosyliert wurden.^[66-67] Die *Koenigs-Knorr-Reaktion* wird seit über 100 Jahren für die Oligosaccharidsynthese verwendet und stetig modifiziert. Beispielsweise verwendeten *Zemplén et al.* Quecksilber-(II)-acetat anstatt eines Silbersalzes,^[68-70] *Helferich* und Mitarbeiter benutzten Quecksilber-(II)-cyanid und -bromid.^[71-73]

Mit der *Koenigs-Knorr-Reaktion* wird eine große Menge an Abfällen produziert, die kaum recyclingfähig sind. Ein Beispiel ist die Herstellung des 2-Nitrophenyl- β -D-galactosids aus Galactose als Edukt, wobei je kg Produkt 10 kg Abfälle produziert werden.^[74-75] Bei der Herstellung von But-3-en-2-yl- β -D-glucosid nach der *Helferich-Reaktion* wird 1g Produkt unter Verwendung von 5g hochgiftiger Quecksilbersalze erzeugt.^[18]

Weitere modifizierte Methoden wurden für die chemische Transglycosylierung nach dem *Koenigs-Knorr-Prinzip* entwickelt. Glycosyl-Trichloracetimide wurden von *Schmidt* und Mitarbeitern als hochwertige Alternative zu Glycosylhalogeniden eingeführt.^[76-77] Glycosylfluoride wurden als Donor unter der Verwendung von starker Lewis-Säure wie z.B. $\text{AgClO}_4/\text{SnCl}_2$ und BF_3 aktiviert.^[78-79] Auch können diese Donoren für die Synthese von Oligosacchariden durch enzymatische Transglycosylierung mit Glycosidasen verwendet

werden.^[80] *Fraser-Reid et al.* beschrieben die Anwendung von *n*-Pentenylglycosiden für die Synthese komplexer Oligosaccharide.^[39,41] *Danishefsky* und Mitarbeiter entwickelten mit der oxidativen Verknüpfung von Glycalen einen neuen Zugang zur stereoselektiven Synthese von Oligosacchariden. Durch diese Verknüpfung erhielten sie α -Glycoside, während bei der direkten Epoxidation des Glycals β -Verknüpfungen erzielt wurden.^[81-82] Nach *Kahne* und Mitarbeiter wurden die Glycosyl-Sulfoxide als aktive Donoren zur Reaktion auch mit sterisch gehinderten Akzeptoren entwickelt.^[83-84] Glycosyl-2-propenyl-carbonate wurden nach *Sinay* *et al.* für die stereoselektive β -Verknüpfung sogar ohne die Hilfe von Nachbargruppen an C-2 des Donors eingesetzt.^[85] Die Gruppen von *Schmidt* und *Wong* haben Glycosyl-Phosphite als Glycosyl-Donoren mit hoher Stabilität gefunden, was für leistungsfähige Synthesen von O-, S-, C-Glycosiden bzw. Glycopeptiden im präparativen Maßstab angewandt wurde.^[86-88] Die Verwendung von Thioglycosiden, die bei den Verfahren von *Koenigs-Knorr*, *Zemplén* und *Helferich* hergestellt und auch als Glycosyl-Donoren verwendet werden können,^[89-91] haben wegen der vergleichsweise aufwendigen Reaktionsschritte wenig Verwendung gefunden (**Abb. I.4**).

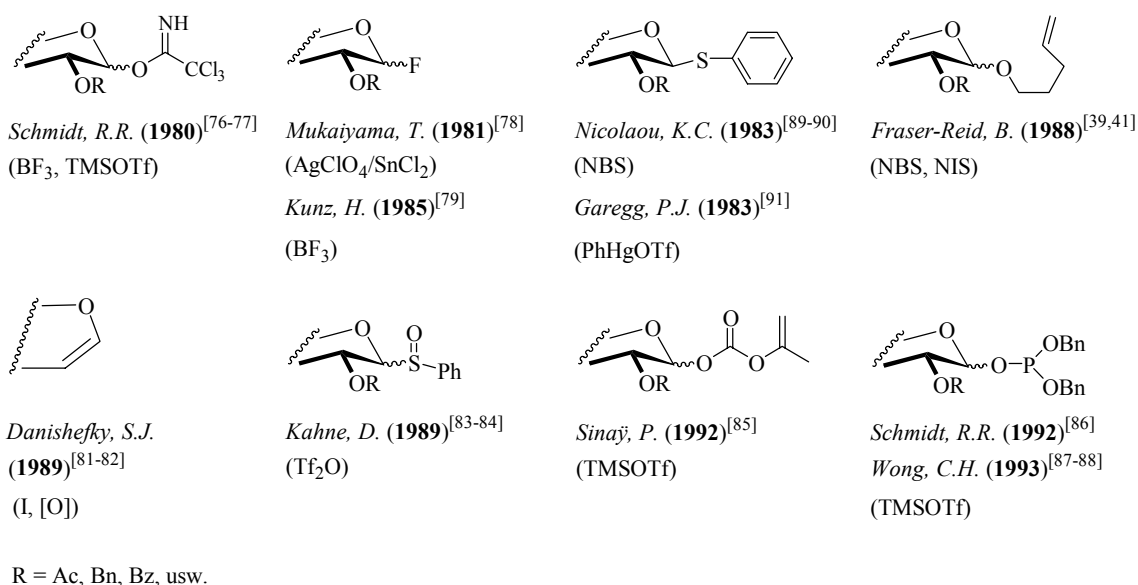


Abb. I.4 Neue Generation von anomeren Abgangsgruppen und deren Aktivatoren.

Das Hauptproblem chemischer Synthesen sind generell die zeitaufwendigen, mühsamen Reaktionsschritte zur Einführung und Umwandlung von Schutzgruppen.^[92]

Bei der Synthese des relativ einfachen Disaccharids β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Xyl nach der *Helferich-Methode* sind beispielsweise sieben separate Reaktionsschritte und drei chromatografische Trennungen erforderlich, wobei insgesamt bei der Reaktionssequenz eine Gesamtausbeute von nur 7% erreicht wurde (**Abb. I.5**).^[93]

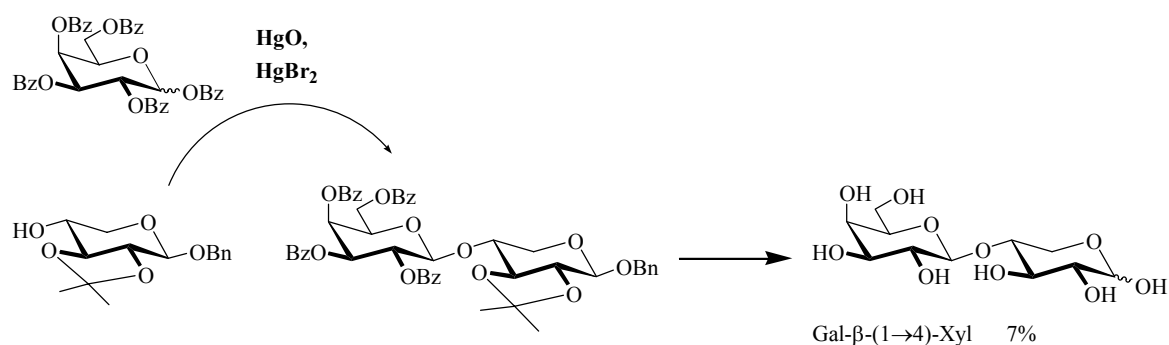
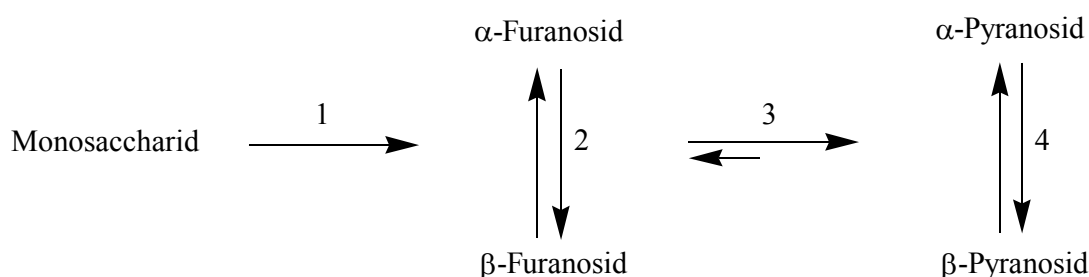


Abb. I.5 Die *Helferich-Variante* bei der Synthese des Disaccharids β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Xyl.

4.1.2. Die *Fischer-Glycosidierung*

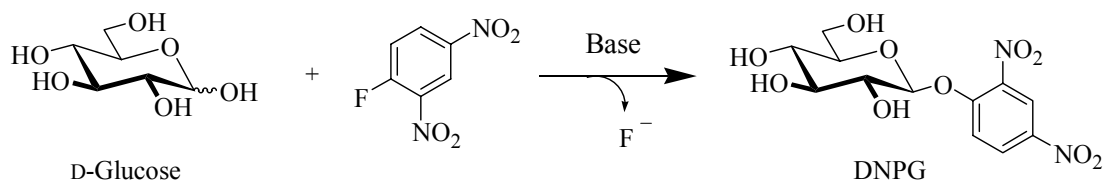
Bei der Glycosidierung nach *Fischer* wird wasserfreies Monosaccharid mit überschüssigem Alkohol in Gegenwart eines elektrophilen Katalysators eingesetzt. Je nach Reaktionsdauer und Temperatur unterscheidet sich die Zusammensetzung der Reaktionsmischung. Bereits bei Raumtemperatur wird das freie Monosaccharid nach kurzer Zeit fast vollständig in die Furanoside umgewandelt.^[94-95] Deren Bildung ist gegenüber der der Pyranoside kinetisch begünstigt, und erst unter Gleichgewichtsbedingungen überwiegen die Pyranoside dank ihrer meist höheren thermodynamischen Stabilität.^[30,96-100]



4.1.3. Nukleophile aromatische Glycosidierung

Freie Mono- oder Disaccharide können regioselektiv an der anomeren Hydroxy-Gruppe mit einem elektronenarmen Aromat als Elektrophil unter basischen Bedingungen in Wasser (oder DMF/15-Crow-5-Ether) glycosidiert werden. D-Glucose wird beispielsweise mit DNFB und Base in wässriger Lösung umgesetzt, nach 24h wird das Produkt 2,4-Dinitrophenyl-β-glucosid (DNPG) in 20% Ausbeute erhalten.^[101] Wenn diese Reaktion im polaren aprotischen Lösungsmittel durchgeführt wird, erhält man DNPG sogar in respektabler Ausbeute von 53%.

Die Bandbreite der letzteren Reaktion wurde jedoch bisher nicht mit anderen Zuckern untersucht.^[102]



4.2. Enzymatische Verfahren

4.2.1. Katalytische Transglycosylierung mit Glycosyltransferasen

Trotz der Tatsache, daß die Glycosyltransferasen *in vivo* meist membranständig für die Transglycosylierung von Lipiden, Peptiden, Proteinen und sogar Zellenoberflächen verantwortlich sind, können sie auch *in vitro* für die Glycosid- und Oligosaccharidsynthese verwendet werden.^[103] Mit Glycosyltransferasen ist die Synthese hoch stereoselektiv und regioselektiv, so dass fast keine Nebenprodukte aufgebaut werden.^[59,62,103-106] Die Verwendung der Glycosyltransferasen hat zwei schwerwiegende Probleme: Erstens sind diese Enzyme sehr schwer in großem Maßstab zugänglich was ihre *Klonierung* und *Expression* in Bakterien und Hefen erforderlich, und daher sehr teuer macht. Zweitens sind auch die benötigten Glycosyldonoren nicht preiswert. Dadurch werden große Reaktionsansätze sehr kostspielig, obwohl auch regenerative zyklische Verfahren von Glycosyltransferasen zusammen mit anderen regenerierenden Enzymen entwickelt wurden. Beispielfhaft ist die Synthese von Allyl-*N*-acetyl-lactosamin,^[107] die ausgehend von Allyl-2-acetamido-2-desoxy- β -glucosid als Glycosylakzeptor mit Glucose-1-phosphat, Phosphoenolpyruvat und

katalytischen Mengen an von UDP in 50% Ausbeute durchgeführt wurde (s.u. **Abb. I.6**). Selten werden Prozesse zur Oligosaccharidsynthese im Gramm- oder Kilogrammaßstab durchgeführt.^[108-109]

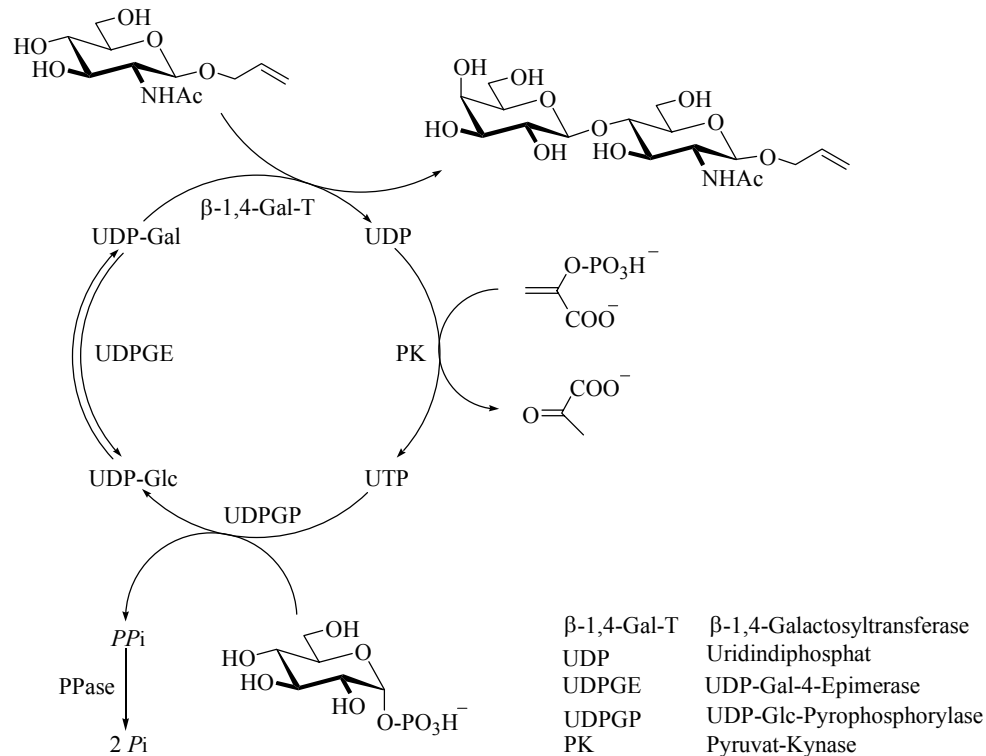
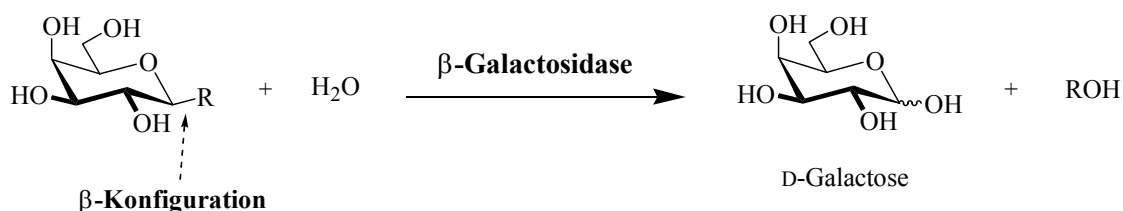


Abb. I.6 Regenerative Verfahrensweise bei der Synthese von Allyl-*N*-acetyl-lactosamin.

4.2.2. Katalytische Hydrolyse von Sacchariden mit Glycosidasen

Die Glycosidasen hydrolysieren *in vivo* glycosidische Bindungen. Sie sind im allgemeinen streng spezifisch bezüglich des glyconischen Teils des Substrats und dessen anomerer Konfiguration. Sie wirken mit Retention oder Inversion der Konfiguration eines Glycosids

(bzw. Saccharids). Präparativ am bedeutendsten sind Glycosidasen, die mechanistisch die Retention der Konfiguration herbeiführen.^[110-111]



R = F, (N-), O-Aryl, O-Alkyl, O-Zucker, O-Aminosäure

Bereits *Emil Fischer* führte Untersuchungen mit Glycosidasen *in vitro* durch, wobei die enzymatische Wirkung auf glycosidische Strukturen untersucht wurde. Einfache Glycoside und Oligosaccharide mit ähnlichen Strukturen wurden mit Rohpräparaten von *Invertin* oder *Emulsin* getestet (s. **Tabelle 1**), die heute als preiswerte α -Glucosidase bzw. β -Galactosidase kommerziell verfügbar sind.^[112-113]

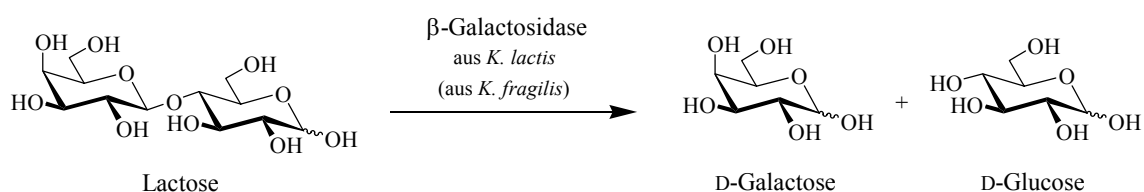
Tabelle 1 Wirkung auf Struktur und Konfiguration mittels enzymatischer Hydrolyse.

Zucker	<i>Invertin</i> (α -Glucosidase)	<i>Emulsin</i> (β -Galactosidase)
α -Methylglucosid	+	-
α -Ethylglucosid	+	-
Sucrose (β -Fru β -(2 \rightarrow 1)- α -Glc β)	+	-
Maltose (α -Glc β -(1 \rightarrow 4)-Glc β)	+	-
β -Methylglucosid	-	+
β -Phenylglucosid	-	+
α -Methylgalactosid	-	-
β -Methylgalactosid	-	+
Lactose (β -Gal β -(1 \rightarrow 4)-Glc β)	-	+

Diese Daten werden von *Lemieux* und *Spohr* zusammengestellt.^[114]

Die α -Glucosidase erwies sich als sehr spezifisch, denn sie hydrolysierte nur α -Isomere. Auch die β -Galactosidase hatte eine hohe Spezifität gezeigt, da nur β -Isomere hydrolysiert wurden, jedoch auch β -Glucoside. Man kann sich vorstellen, dass das Rohpräparat noch andere β -Hexosidase enthielt, die die Hydrolyse von β -Glucosiden durchführt. *Fischer* kannte damals noch nicht die Konfiguration der Glycoside am anomeren C-Atom, aber er hatte schließlich richtig angenommen, dass die Glycosidasen spezifisch für die räumliche Struktur der Zucker sind. Im Jahr 1894 erschien eine seiner bedeutendsten Arbeiten, in der er sich mit der enzymatischen Hydrolyse von Glycosiden und Oligosacchariden befasste, und in der er erstmals das Schlüssel-Schloss-Prinzip postulierte.^[113]

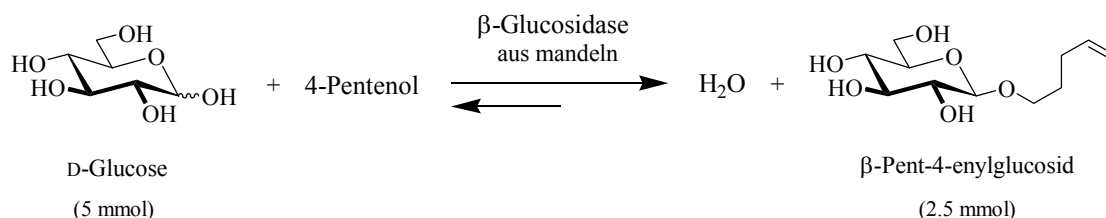
Noch heute wird die β -Galactosidase für die Hydrolyse von Lactose verwendet. Obwohl der Milchzucker sich in den Milchdrüsen weiblicher Säuger bildet, sind weltweit etwa dreiviertel der erwachsenen Bevölkerung intolerant gegen Lactose. Wenn das Disaccharid aus der Nahrung im Körper nicht hinreichend durch die Lactosidase hydrolysiert wird, können Bakterien es im Dickdarm fermentieren. Fettsäuren mit geringer Kettenlänge, aber auch Kohlendioxid und Wasserstoff werden produziert, und als Folge können beispielsweise Durchfall, Krämpfe, Blähungen usw. auftreten.^[115-118] Die Hydrolyse der Lactose in Milch wurde mit immobilisierter β -Galactosidase aus *Kluyveromyces lactis* untersucht.^[119] Ebenfalls wurde die Hydrolyse preiswerter Lactose aus der Molke mit β -Galactosidase aus *K. fragilis* durch Verfahren mit freiem oder immobilisiertem Enzym durchgeführt, um die resultierende süßere freie Glucose und Galactose biotechnologisch verwenden zu können.^[120]



Die hydrolytische Spezifität von Glycosidasen wird üblicherweise mit α - oder β -Nitrophenylglycosid getestet. Die katalytische Aktivität wird als Umsatzrate (U) ausgedrückt, die angibt, wie viele μmol Substrat von einer bestimmten Enzymmenge pro Minute umgesetzt werden.

4.2.3. Glycosidase-katalysierte Glycosidierung zur Umkehr-Hydrolyse

Glycosidasen sind eine Klasse von Enzymen, die gerade in jüngerer Zeit vielfach in der Kohlenhydratsynthese verwendet werden.^[59,64,121-122] Da Glycosidasen relativ unspezifisch bezüglich der aglyconischen Komponente sind, ist die enzymatische Hydrolyse eines Glycosids oder Oligosaccharids umkehrbar und kann bei geeigneter Wahl der Reaktionsbedingungen zur Synthese herangezogen werden. Wenn man beispielsweise eine gepufferte Lösung einer Glycose in wenig Wasser, aber Alkohol im Überschuss mit der Glycosidase versetzt, wird das Gleichgewicht zugunsten der Synthese eingestellt. Zwar bleibt die Hydrolyse als konkurrierende Reaktion bestehen, trotzdem werden Alkylglycoside stereoselektiv gebildet. Das Verfahren ist als Umkehr-Hydrolyse bekannt.^[123-129]



Der Erfolg der Reaktion hängt von der Zusammensetzung des konzentrierten alkoholischen Puffers, aber auch von der Solvenstoleranz der verwendeten Glycosidase ab. So konnten unter bestimmten Umsetzungen hohe Konzentrationen von Alkohol im Wasser von 80:20 bis 92:08 (v:v) bei der Glycosidierung freier Glycosen verwendet werden (s.u. **Tabelle 2**).

Tabelle 2 Einfache Glycoside durch Umkehr-Hydrolyse mit Glycosidasen.^[130-131]

Glycosidase	Quelle	Hexose	Alkohol	Alkohol/Wasser (v:v)	Ausbeute %
β -Glucosidase	Mandeln	Glucose	1,6-Hexandiol	90:10	61
β -Glucosidase	Mandeln	Glucose	4-Pentenol	92:08	50
β -Glucosidase	Mandeln	Glucose	Allylalkohol	90:10	62
β -Glucosidase	Mandeln	Glucose	Benzylalkohol	90:10	40
β -Glucosidase	Mandeln	Glucose	2-Me ₃ Si-Ethanol	55:5.6 ^a	11
β -Galactosidase	<i>A. oryzae</i>	Galactose	1,6-Hexandiol	80:20	48
β -Galactosidase	<i>A. oryzae</i>	Galactose	4-Pentenol	90:10	22
α -Galactosidase	<i>A. niger</i>	Galactose	1,6-Hexandiol	80:20	47
α -Galactosidase	<i>A. niger</i>	Galactose	4-Pentenol	90:10	37
β -Mannosidase	<i>H. pomatia</i>	Mannose	1,6-Hexandiol	80:20	12

a: 39.4 % (v:v) *tert*-Butanol wurde als Cosolvens zugegeben.

Eine Restkonzentration an Wasser ist sehr wichtig für die Durchführung der Reaktion, denn ohne Wasser weist das Enzym keine Aktivität auf. Überdies wird das Monosaccharid bei höherer Alkohol-Konzentrierung in der Reaktion nicht mehr ausreichend gelöst.

Einfache β -Glucoside wurden mit preiswerter β -Glucosidase aus Mandeln aus D-Glucose in Ausbeuten von 11 bis 62% erhalten. β -Galactoside erhielt man mit Ausbeuten von 22 und 48%. Mit α -Galactosidase aus *Aspergillus niger* wurde eine Ausbeute von 37 bzw. 47% an den α -Alkylgalactosiden erzielt. Die β -Glycosidierung von Mannose wurde nur noch in einer geringen Ausbeute von 12% erreicht.

Alle diese Reaktionen wurden zur Gleichgewichtseinstellung über mehrere Tage bei 50°C (thermodynamische Kontrolle) durchgeführt (s.u. **Abb. I.7**). Da die Enzyme in der hohen Alkohol-Konzentrierung schnell denaturieren, sind hierbei große Mengen erforderlich. Daher wurden die Reaktionen nur im Milligramm-Maßstab durchgeführt. Überdies war die chromatografische Trennung des Produkts von den entstandenen Nebenprodukten mühsam.

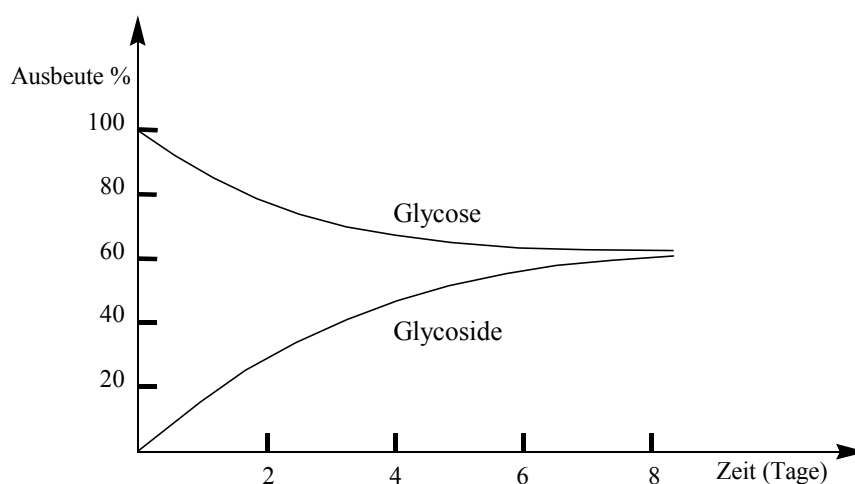


Abb. I.7 Ausbeute-Diagramm einer Glycosidierung bei der Umkehr-Hydrolyse.

Die Synthese von Oligosacchariden durch Umkehr-Hydrolyse erfolgt meist nur mit schlechten Ausbeuten, da ein Oligosaccharidgemisch erzeugt wird, das auch im präparativen Maßstab in der Regel nur mit aufwendigen HPLC-Techniken trennbar ist.^[132-133]

4.2.4. Katalytische Transglycosylierung mit Glycosidasen

Glycosidasen ermöglichen über eine Transglycosidierung die Synthese einfacher Glycoside oder Oligosaccharide. Bei der Reaktion werden meist NPG, aber auch Oligosaccharide und Glycosylfluoride als reaktive Donoren verwendet.^[134-138] Oft ist eine gesättigte Lösung von Glycosyl-Donor oder -Akzeptor notwendig.

Einfache β -Glucoside können durch Transglycosylierung von kommerziellem 4-Nitrophenyl- β -D-glucosid (ca. 30 DM pro 3.3 mmol) mit verschiedenen Alkylalkoholen synthetisiert werden. Der Glucosyl-Donor wird dazu in wässrigem alkoholischem Puffer mit der β -Glucosidase aus Mandeln inkubiert und der Umsatz der Transferreaktion wird chromatografisch durch HPLC-Analyse ermittelt. Die Ausbeuten an verschiedenen Alkyl-Glucosiden sind dabei mit 14-36% nur relativ gering (**Abb. I.8**).^[139] Das 4-Nitrophenyl- β -D-glucosid kann man aus D-Glucose nur durch eine chemische Transglycosylierung nach der *Koenigs-Knorr-Methode* oder seinen Varianten synthetisieren. Da diese mehrstufige Synthese selbst verlustreich ist, sind dementsprechend die Gesamtausbeuten bezüglich des Monosaccharids noch geringer und der gesamte Syntheseaufwand deutlich höher.

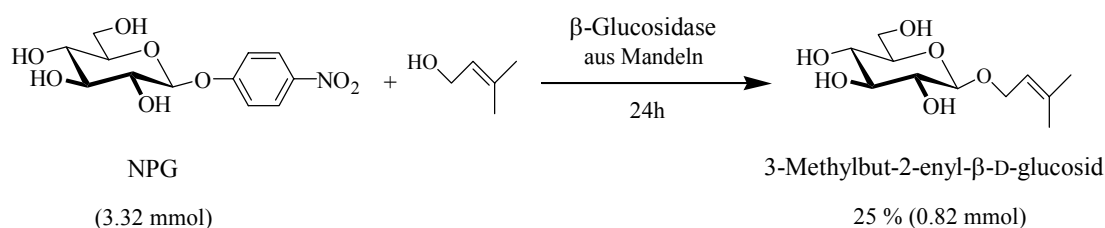
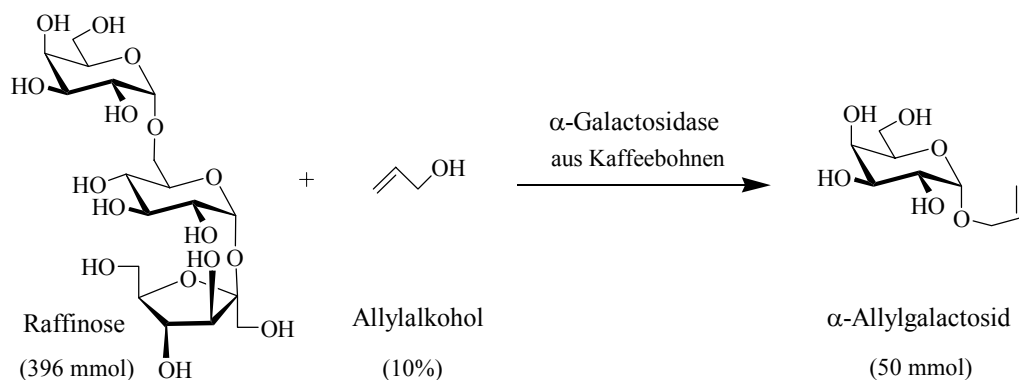
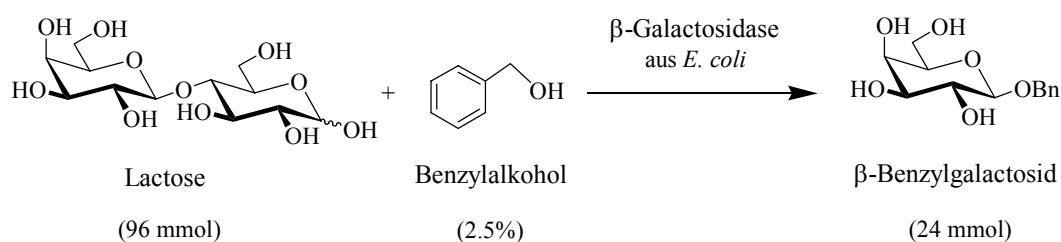


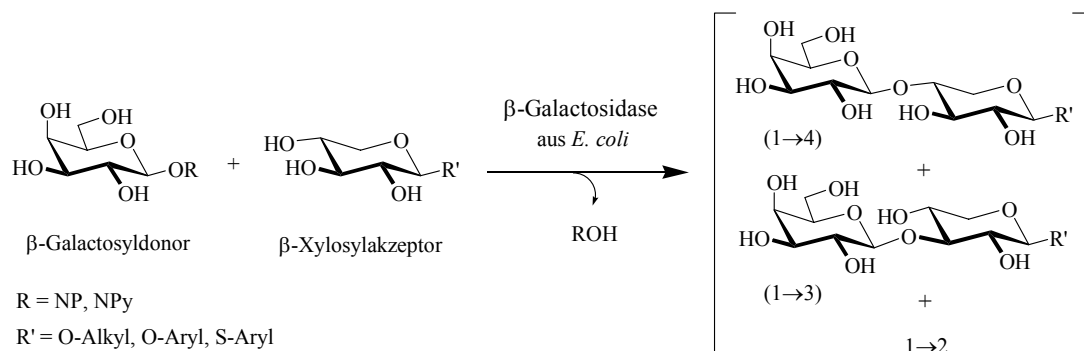
Abb. I.8 Katalytische Transglycosylierung für die Synthese des β -Glucosids.

Daher hat die Nutzung von bestimmten natürlichen Oligosacchariden als Glycosyldonor eine ökonomische Bedeutung. Beispielsweise kosten 700 mmol des β -Galactosids Lactose weniger als 5 DM oder 46 mmol des α -galactosylhaltigen Trisaccharids Raffinose ca. 30 DM. In größerem Maßstab wurden beispielsweise mit Allyl- bzw. Benzylalkohol ausgehend von 100 (bzw. 33g) Lactose als Galactosyl-Donor mit der β -Galactosidase aus *E. coli* 20g β -Allyl- (bzw. 6.5g β -Benzyl)-galactosid durch Transglycosylierung gewonnen. Ebenso erhielt man aus 200g Raffinose mit der α -Galactosidase aus Kaffeebohnen 11g α -Allyl-Galactosid.^[140] Die Synthese von einfachen Glycosiden aus Oligosacchariden besitzt in der Praxis allerdings den Nachteil, daß vermehrt Nebenprodukte abgetrennt werden müssen, da die freigesetzte Glycose auch als weiterer Glycosyl-Donor in einer Umkehr-Hydrolyse und als Akzeptor konkurrierender Transglycosylierungen reagieren kann.



Aus ökonomischen Gründen werden Glycosidasen vielfach in der Oligosaccharidsynthese verwendet, sie haben sich jedoch als wenig regioselektiv erwiesen. Bei der Verknüpfung zweier Pyranosen können dabei bis zu vier Produkte [z.B. (1→2), (1→3), (1→4), und (1→6)-Disaccharid] erhalten werden, die wegen ihrer sehr ähnlichen physikochemischen Eigenschaften in der Regel nicht einfach zu trennen sind. Nach Beendigung der Reaktion muss die enzymatische Aktivität entfernt werden, um die unerwünschte Hydrolyse des gebildeten Produktes zu verhindern. Dies wird bei preiswerten Glycosidasen im Regelfall durch Denaturieren des Proteins erreicht, wozu man die Reaktionslösung kurz auf hohe Temperaturen erhitzt.

Vor einigen Jahren wurde die interessante Beobachtung gemacht, dass eine konfigurative Veränderung des Akzeptors an dessen anomerem Zentrum die Regioselektivität der Transferreaktion deutlich beeinflussen kann. In einer Reihe von Arbeiten wurden die diesbezüglichen Möglichkeiten sondiert.^[140-141] In Abhängigkeit der chemischen Natur des Aglycons eines Akzeptor-Glycosids sowie dessen anomerer Konfiguration war die Regioselektivität der Transferreaktion signifikant verschieden.



Für die Synthese des Disaccharids Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Xyl durch Galactosyl-Transferreaktion mit β -Galactosidase aus *E. coli* wurden beispielsweise oft β -Aryl-Galactoside als Donor und Aryl- oder Alkyl- β -D-xyloside als Akzeptor verwendet. Neben dem gesuchten β -(1 \rightarrow 4)- entsteht auch das β -(1 \rightarrow 3)-Disaccharid, während das β -(1 \rightarrow 2)-Isomere wohl aus sterischen Gründen nicht beobachtet wird. Verschiedene β -Xylosylakzeptoren mit einer Variation am Aglycon wurden für die Transglycosylierung getestet (s.u. **Tabelle 3**).

Tabelle 3 (1 \rightarrow 4)-Regioselektivität durch Transglycosylierung.^[142-145]

R (Galactosyldonor)	R' (Xylosylakzeptor)	Ausbeute	Verhältnis (1\rightarrow4)/(1\rightarrow3)
PhNO ₂ - <i>p</i>	O-MU	21	3.1:0.9
PyNO ₂ - <i>o</i>	O-PhNO ₂ - <i>p</i>	36	3.6:0.4
PyNO ₂ - <i>p</i>	O-PhNO ₂ - <i>p</i>	29	3.6:0.4
PhNO ₂ - <i>p</i>	O-PhNO ₂ - <i>p</i>	19	3.5:0.5
PhNO ₂ - <i>o</i>	O-CH ₃	6	1.0:0
PhNO ₂ - <i>o</i>	O-CH ₂ Ph	30	1.1:2.9
PhNO ₂ - <i>o</i>	O-CH ₂ CH ₂ Ph	25	2.2:1.8
PhNO ₂ - <i>o</i>	O-Ph	23	2.3:1.7
PhNO ₂ - <i>o</i>	S-Ph	19	3.0:1.0
PhNO ₂ - <i>o</i>	O-PhOCH ₃ - <i>p</i>	20	2.5:1.5
PhNO ₂ - <i>o</i>	O-PhNO ₂ - <i>p</i>	18	3.4:0.6

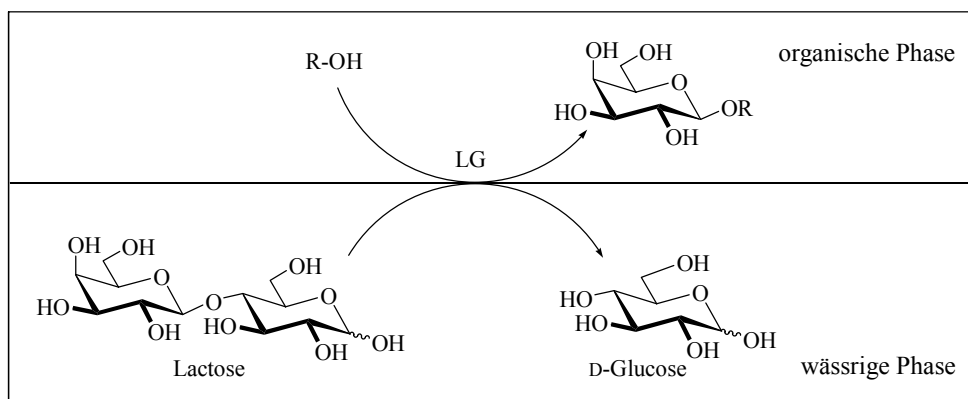
PhNO₂ = Nitrophenyl-, PyNO₂ = Nitropyridyl-, MU = 4-Methyl-7-Umbelliferyl-.

Das Aglycon am Galactosyl-Donor wurde auch variiert. Im Vergleich zu den konventionellen NPG zeigen die *ortho*- und *para*-Nitropyridylgalactoside eine erhöhte Löslichkeit in Wasser, wodurch eine sehr konzentrierte Lösung (600 mM) eingesetzt werden konnte. Diese Donoren mit NPG als Akzeptor ergaben die höchsten Ausbeuten von 36 bzw. 29%, jedoch wurde daneben das (1 \rightarrow 3)-Isomer zu 10% gebildet, dessen Abtrennung mühsam ist.^[145] Auch in

weiteren Varianten mit NPG als Donoren (100 mM) wurde das (1→3)-Isomer immer in Anteilen von 12-45% gebildet, und unter Verwendung von β -Benzyl-Xylosid als Akzeptor wurde das ungewünschte Regioisomer β -Gal-(1→3)- β -Xyl-Bn sogar als Hauptprodukt mit einem Anteil von über 70% erhalten.^[142-143] Nur in Falle Methoxy-Gruppe als Aglycon wurde die höchste Regioselektivität erzielt, da keine (1→3)-Verknüpfung beobachtet wird; die Ausbeute dieser Reaktion beträgt allerdings nur 6%.

Um die konkurrierende Hydrolyse als der natürlichen Funktion der Glycosidasen zu hemmen, können inaktive wassermischbare Cosolventien (z.B. *tert*-Butanol, Aceton, Acetonitril oder DMF) in manchmal beträchtlichen Mengen der Reaktion zugegeben werden.^[59,140] Eine Variante zur Verringerung der unerwünschten Hydrolyse besteht in der Art der Enzym-Abtrennung vom Reaktionsgemisch nach der Synthese. Die Glycosidase kann hierzu auf einem festen Träger fixieren werden, so dass am Ende der Reaktion die Festphase mit dem Enzym abfiltriert und für weitere Reaktionen recycelt werden kann. Diese Methode erwies sich allerdings vielfach als weniger erfolgreich, denn die Aktivität und Regioselektivität der Glycosidase wurde durch die Immobilisierung anscheinend verringert.^[146] Eine andere Möglichkeit ist die Enzym-Abtrennung durch Ultrafiltration. Bestimmte Membranen lassen die Permeation von Verbindungen mit einem Molekulargewicht bis zu maximal 1 oder 10 kDa zu, so dass die Glycosidasen mit Molekulargewichten von 14 bis 170 kDa effektiv zurückgehalten werden.^[108] Die chemische Modifizierung der Glycosidase-Struktur ist eine weitere Option, um den Anteil der Hydrolyse während der Reaktion zu unterdrücken. Verschiedene β -Galactosidasen wurden z.B. an langkettige Lipide gebunden, wodurch ermöglicht wurde, diese *lipidgebundenen Galactosidasen* (LG) in organischer Phase zu lösen. Sobald Lactose (Galactosyl-Donor) und ein hydrophober Akzeptor in wässrigem bzw.

organischem Puffer mit einer LG behandelt wurden, konnte der Galaktosyldonor mit einem Alkohol transglycosyliert werden, ohne dass hydrolysierte D-Galactose entstand.



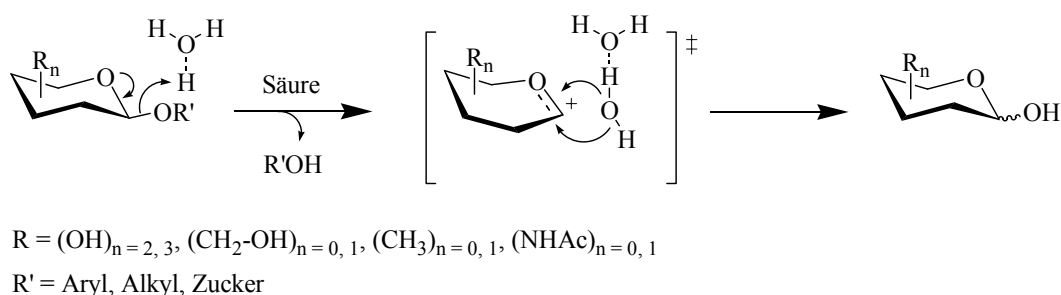
Die Transfer-Reaktion wurde im präparativen Maßstab mit primären, sekundären und tertiären Alkoholen in Ausbeuten von 3 bis 82% durchgeführt. Das wenig nukleophile *para*-Nitrophenol wurde auch transglycosyliert, dadurch wurde 4-Nitrophenyl- β -galactosid im Maßstab bis 2g in 52% Ausbeute erzeugt. β -Galactosyltransfer wurde mit 1,2,3,4- oder 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-glucose als Akzeptor in 66 bzw. 45% Ausbeute durchgeführt. Ebenfalls wurde 5-Phenylpentyl- β -galactosid in 66% Ausbeute erreicht, die wegen der Hemmung des Enzyms nicht zunehmen konnte.^[147-148]

Bei der Oligosaccharidsynthese mit Glycosidasen wird oft ein Produkt-Gemisch erzeugt, das meist chromatografisch durch präparative HPLC aufwendig getrennt werden muß. Diese Methode ist jedoch auf kleine Mengen beschränkt und wenig preisgünstig. Anomerengemische können oft günstig mittels Aktivkohle oder an Aktivkohle/Kieselgur-Mischungen getrennt werden.^[45]

5. Mechanistische Aspekte

5.1. Nicht-enzymatische Hydrolyse von einfachen Glycosiden

Die Hydrolyse von Glycosiden verläuft durch Spaltung glycosidischer Bindung zwischen dem anomeren Zentrum und dem Aglycon. Die Reaktion ist eine nukleophile Substitution am C-1. Eine direkte Substitution des Aglycons durch OH^- oder H_2O im Sinne einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion ist nicht möglich, da dies eine Inversion am anomeren C-Atom erfordern würde, über ein sterisch ungünstiges Intermediat mit einer Twist-Wannen- oder Wannen-Konformation. Dies würde eine hohe Aktivierungsenergie erfordern, auch bei einer H^+ -katalysierten Trennung des Aglycons.



Eine $\text{S}_{\text{N}}1$ -artige Reaktion ist dagegen energetisch viel günstiger, da das intermediäre Glycosyl-Kation mit Hilfe einer mesomeren Ladungsverteilung zwischen C-1 und dem Ring-O-Atom stabilisiert wird. Die ungünstige Bildung eines getrennten Ionenpaares bei der entstehenden Spaltung kann durch Protonierung des glycosidischen O-Aglycons vermieden, was die Reaktionsbeschleunigung durch saure Katalysatoren erläutert.

Eine basisch katalysierte Hydrolyse wird nur bei Glycosiden von Phenolen und Enolen beobachtet. Aryl- oder Vinylglycoside werden durch einen intramolekularen Angriff der deprotonierten 2-Hydroxy-Gruppe gespalten, wobei 1,2-Epoxide aufgebaut werden. Durch Folgereaktionen wie Hydrolyse oder Isomerisierung wird das 1,2-Epoxid wieder geöffnet.^[149]

Eine Hydrolyse von Glycosiden ohne Säure- oder Basekatalyse ist sehr langsam, sogar bei hohen Temperaturen. Die Geschwindigkeit der sauer katalysierten Hydrolyse von Glycosiden ist von der anomeren Konfiguration und der Art des Aglycons sowie von der Position manches Substituents abhängig (vgl. **Tab. 4**).^[150-151]

Tabelle 4 Geschwindigkeitskonstanten für die Glycosid-Hydrolyse in 2N HCl.^[8]

D-Glycopyranosid		10 ⁵ k, 60°C (s ⁻¹)*
Methyl-	α-gluco-	0,708
	β-gluco-	1,26
	α-galacto-	3,55
	β-galacto-	5,13
Phenyl-	α-gluco-	38,0
	β-gluco-	9,33
	α-galacto-	128,0
	β-galacto-	24,5
4-Nitrophenyl-	α-gluco-	25,1
	β-gluco-	2,88

* Geschwindigkeitskonstante bezüglich der Hydroxy-Gruppe in Position 2.

Regelmäßig scheint bei **Alkylglycosiden** die α-D-Form, mit weniger Ausnahmen, resistenter gegen Säurehydrolyse zu sein als das entsprechende β-Anomere. Es kann sein, dass die konjugierte Säure im Falle eines äquatorialen Aglycons durch höhere Solvation besser stabilisiert werden kann, dass aber andererseits der stabilisierende, inverse anomere Effekt bei einem äquatorialen Oxonium-Ion im Gegensatz zu einem axialen auch zum Tragen kommt und demnach einer Bindungsstabilisierung der höheren Konzentration an konjugierter Säure entgegenwirkt. Diese gegenläufigen Einflüsse sind, vergleichbar mit jenen der Aglyconstruktur, für die relativ kleinen Unterschiede der Hydrolyse-Geschwindigkeiten

verantwortlich zu machen. Die Anomerenpaare der **Arylglycoside** verhalten sich gerade umgekehrt. Möglicherweise überwiegt bei einem raumfüllenden Aglycon (Phenyl-Gruppe) die sterische Wechselwirkung und führt damit zur relativen Stabilisierung des Glycosids mit äquatorialem Substituenten (β -D-Glycopyranoside).

5.2 Hydrolyse von Glycosiden mittels Glycosidasen

Mechanistisch kann eine glycosidische Spaltung durch Glycosidasen auf zwei diastereoselektiven Wegen erfolgen. Obwohl der glyconische Teil des gespaltenen Glycosids als freier Zucker der spontanen Mutarotation unterliegt, konnte man zeigen, dass einige Glycoside unter Inversion der anomeren Konfiguration, die anderen aber unter Retention hydrolysiert werden.^[152-156] Da der Reaktionspartner Wasser normalerweise in großem Überschuss vorhanden ist, ist die wässrige Hydrolyse mit Glycosidasen unter physiologischen Bedingungen vollständig. In einigen Fällen lassen sich allerdings auch Glycosidierungen oder Transglycosylierungen durchführen, wenn das Enzym potentielle Akzeptoren wie z.B. andere Zucker oder Alkohole gegenüber Wasser bevorzugt zu binden vermag. Die **invertierenden Glycosidasen** verwenden einen direkten Spaltungs-Mechanismus mittels eines zyklischen Carboxonium-Ions als Zwischenstufe. Zwei Carboxy-Gruppen werden in Nachbarschaft zum anomeren C-Atom des gebundenen Substrats in einem Abstand von etwa 11 Å gegeneinander angeordnet. Während eine Carboxylat-Gruppe zum nukleophilen Angriff die Verbindung R"OH deprotoniert, katalysiert die andere die glycosidische Abspaltung durch Protonen-Übertragung (s. **Abb. I.9**).

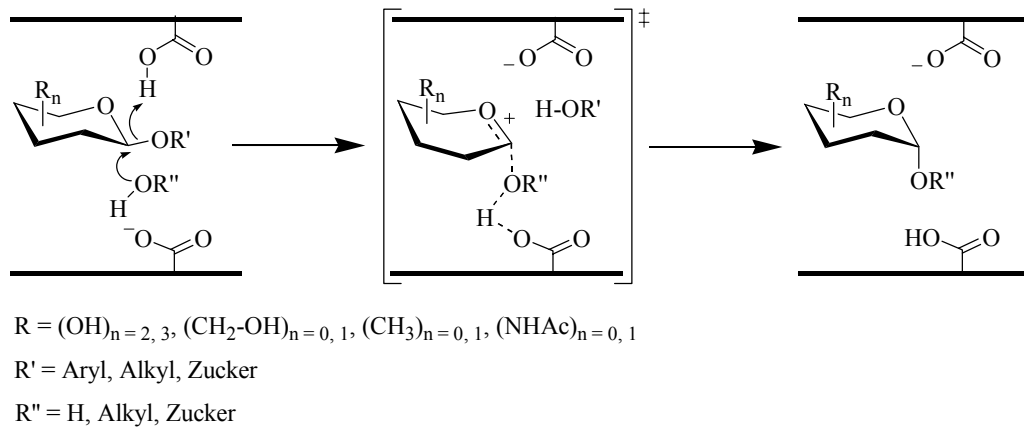


Abb. I.9 Katalyse-Mechanismus von invertierenden Glycosidasen.

Der katalytische ***Retentions-Mechanismus*** wird durch eine Doppel-Abspaltung durchgeführt, wobei ein kovalentes Glycosyl-Enzym-Intermediat aufgebaut und über eine zyklische Carboxonium-Ion-Zwischenstufe wieder gespalten wird (**Abb. I.10**). Aminosäurereste aktivieren ebenfalls die Hydrolyse, aber in diesem Fall sind die Carboxy-Gruppen nur etwa 5.5 Å voneinander entfernt. In diesen Enzym-Klassen katalysiert eine einzige Carboxygruppe als Protonen-Donor die enzymatische Carboxy-Substitution und als Protonen-akzeptierende-Carboxylat-Gruppe die enzymatische Abspaltung.

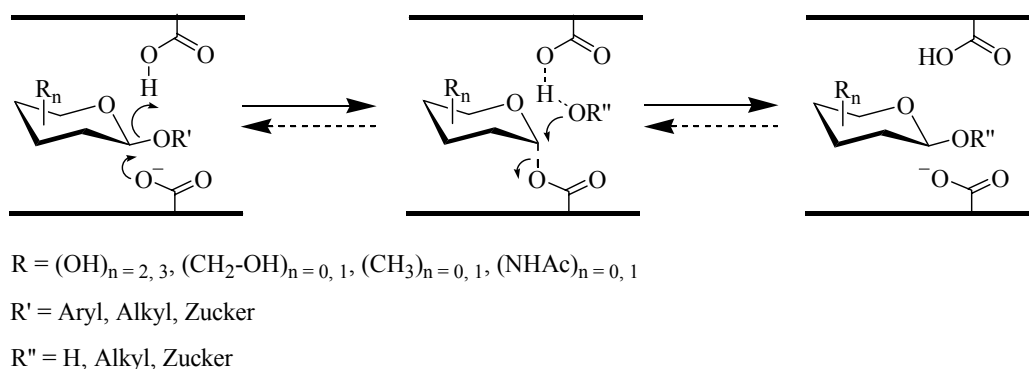


Abb. I.10 Retentions-Mechanismus von Glycosidasen.

II. Zielsetzung

Kohlenhydrate mit definierter Konfiguration sind aufgrund ihrer weitreichenden Bedeutung für physiologische Prozesse für Biologen, Biochemiker und die pharmazeutische Entwicklung von besonderer Bedeutung. Die Synthese komplexer, biologisch aktiver Saccharide stellt eine besondere Herausforderung für Synthesechemiker dar, so daß die Entwicklung von alternativen Syntheseverfahren wie beispielsweise die Festphase-Synthese oder die kombinatorische Synthese immer mehr an Bedeutung gewinnen.^[157-160] Die selektive Verknüpfung zweier Monosaccharide zu einem Disaccharid mit definierter Konfiguration ist keine triviale Aufgabe, weil jedes einzelne Monosaccharid drei, vier oder fünf Hydroxy-Gruppen mit ähnlicher Reaktivität, sowie vier oder fünf Stereozentren aufweist, deren relative Konfiguration die individuelle Reaktivität beeinflussen können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer praktikablen Variante für die Synthese einfacher α - oder β -Glycoside.

Ausgangspunkt war die Erkenntnis, daß α,β -anomere Glycosidgemische leicht und mit guten Ausbeuten durch die *Fischer-Synthese* gewonnen werden können. Es sollte nun untersucht werden, ob diese Gemische durch partielle Hydrolyse mit α - oder β -Glycosidasen selektiv differenziert werden können. Wenn ein α,β -Glycosidgemisch mit einer β -Glycosidase inkubiert wird, sollte spezifisch nur das β -Anomer hydrolysiert und somit das α -Glycosid anomenrein erhalten werden. Das durch Hydrolyse erzeugte Monosaccharid und das

verbleibende α -Glycosid weisen deutlich verschiedene physikalische Eigenschaften auf und wären folglich weit einfacher zu trennen als die ursprünglichen Glycosidgemische. Nach demselben Prinzip könnte das α,β -Glycosidgemisch mit einer α -Glycosidase umgesetzt werden, wobei das korrespondierende β -Glycosid erhalten werden sollte (**Abb. II.1**).

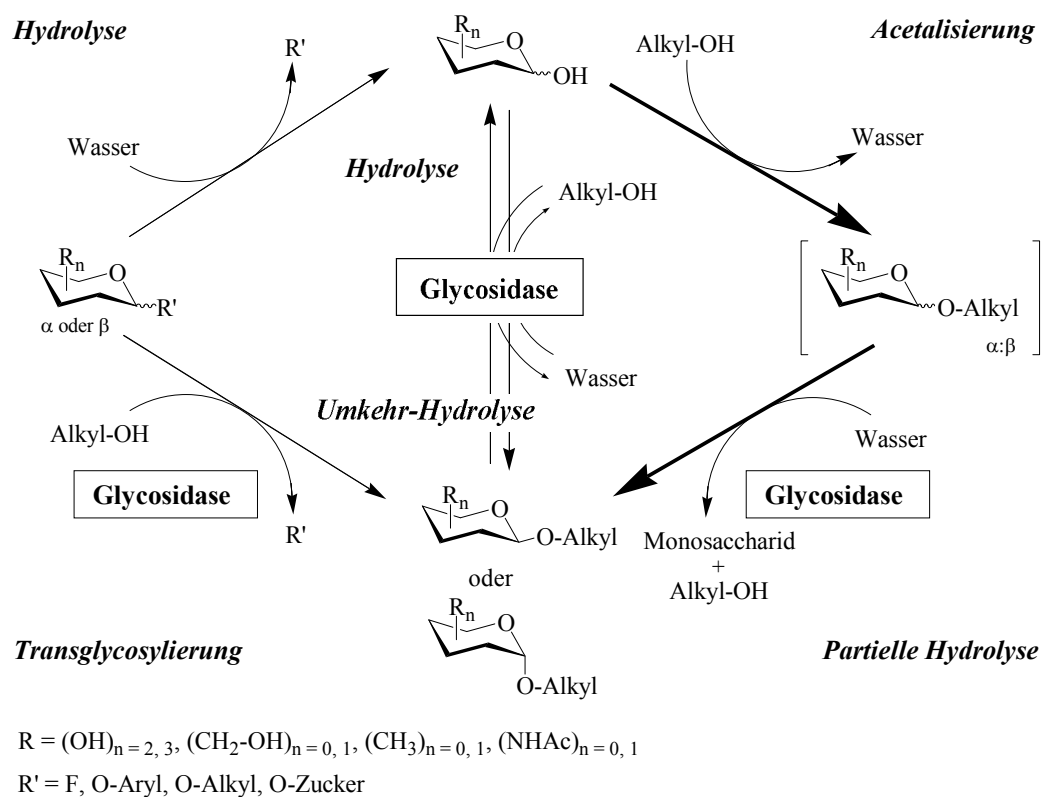


Abb. II.1 Glycosidasekatalyse zur Synthese einfacher Glycoside durch Transglycosylierung (*links*), Umkehr-Hydrolyse (*Mitte*) bzw. partielle Hydrolyse (*rechts*) der einfachen Glycoside.

Die *Fischer-Reaktion* kann mit jedem Monosaccharid durchgeführt werden. Bei der Acetalisierung kann man als Aglycon verschiedene Alkohole wie z.B. Allyl- oder Benzyl-Alkohol verwenden. Die hieraus resultierenden Anomerengemische sollten sowohl mit α - als auch β -Glycosidasen getestet werden, soweit die benötigten Glycosidasen kommerziell verfügbar sind.

Da die Regioselektivität in der Transglycosylierung sowohl durch Form und Konfiguration des Aglycon des Glycosylakzeptors wesentlich beeinflusst wird, könnte man die resultierenden anomenenreinen Glycoside als Testsubstrate für die Disaccharidsynthese verwenden.

III. Allgemeiner Teil

1. Synthese von einfachen Glycosiden

Freie Monosaccharide wie z.B. D-Glucose, D-Galactose, D-Xylose, D-Arabinose, L-Arabinose und *N*-Acetyl-D-glucosamin sind preiswert und für die Herstellung von einfachen Glycosiden auch im Gramm-Maßstab geeignet. Andere Monosaccharide wie beispielsweise *N*-Acetyl-D-galactosamin und L-Fucose, die oft als Bausteine für die Synthese von Oligosacchariden und Glycokonjugaten Verwendung finden, sind allerdings nicht billig und deshalb nur im kleinen Maßstab nutzbar. Der Einsatz freier D-Mannose ist dagegen uninteressant, da die Acetalisierung nach *Fischer* hoch stereoselektiv die α -Alkyl-mannoside liefert.^[39] Glycuronsäuren wie z.B. D-Glucuronsäure, D-Galacturonsäure und L-Iduronsäure können unter den Bedingungen der Acetalisierung nicht effizient eingesetzt werden, da hierbei primär die entsprechenden Ester erhalten werden.

Für die Acetalisierung freier Monosaccharide wurden im Folgenden zunächst Allylalkohol, 4-Pentenol und Benzylalkohol gewählt. Nach der partiellen enzymatischen Hydrolyse der entsprechenden α,β -Anomerengemische mit α - oder β -Glycosidasen sollten sich Derivate der Allyl-, Pent-4-enyl- bzw. Benzyl-Glycoside leicht durch Isomerisierung, intramolekulare Zyklisierung bzw. Hydrierung entschützen und z.B. in die Synthese von Oligosacchariden einsetzen lassen.^[27,41,44] Alternativ können die Allyl- und Pent-4-enylgruppen durch Reaktionen an der Doppelbindung beispielsweise für die Synthese von Glycokonjugaten benutzt werden.^[24-26,42-43]

1.1. Acetalisierung nach der *Fischer-Synthese*

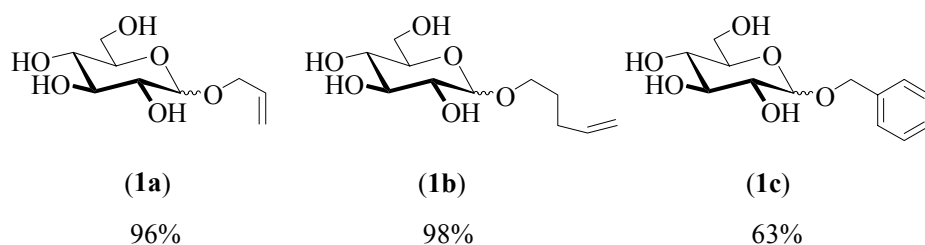
Für die saure Acetalisierung von freien Monosacchariden muß der Alkohol im Überschuß eingesetzt werden, um die Oligomerisierung der Glycose selbst zu unterdrücken. Das Produkt ist in der Regel ein Anomerengemisch der einfachen Glycoside in furanoider und/oder pyranoider Form. Furanoside entstehen kinetisch durch ein intermediäres Carbenium-Ion, während die stabileren Pyranoside direkt oder durch Anomerisierung der Furanoside im thermodynamischen Gleichgewicht gebildet werden. So kann man nach kurzer Reaktionszeit bei Raumtemperatur Furanoside erhalten,^[94-95] während die entsprechenden Pyranoside bei hoher Temperatur und längerer Reaktionsdauer gewonnen werden. Als saure Katalysatoren werden protische Säuren wie zum Beispiel wässrige Salzsäure, Camphersulphonsäure sowie Ionentauscher oder Lewis-Säuren wie beispielsweise FeCl_3 und BF_3 -Etherat verwendet.^[55,96-100] Elegant ist hierbei besonders der Einsatz von Ionentauscher (H^+ -Form) oder flüchtigem BF_3 -Etherat, da die entsprechenden Produkte leicht durch Abfiltration bzw. Evaporierung des Katalysators erhalten werden können.^[30]

1.1.1. Acetalisierung von Hexosen

Als erste Umsetzung wurde D-Glucose mit Allylalkohol in Gegenwart von saurem Ionentauscher (H^+ -Form) bei 90°C acetalisiert. Nach 2h war die eingesetzte Glucose vollständig umgesetzt (DC-Kontrolle, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 17/3). Der Ionentauscher wurde abfiltriert und der Allylalkohol im Vakuum entfernt. Der gelbliche Rückstand wurde durch Extraktion mit Essigester gereinigt. Das Anomerengemisch $\alpha:\beta=4.5:2.5$ von Allylglucopyranosid (**1a**) wurde in 96% Ausbeute erhalten. Das α/β -Verhältnis wurde durch ^1H -NMR-Spektroskopie zu 4.5:2.5 bestimmt.

Bei der Acetalisierung von D-Glucose mit 4-Pentenol wurde die Lösung mit saurem Kationentauscher bei 90°C 1h lang gerührt. Der Ionentauscher wurde abfiltriert und der Überschuß an teurem 4-Pentenol durch Extraktion mit Ether und anschließende Destillation wiedergewonnen.^[161] Das Anomergemisch **1b** entstand mit einer Ausbeute von über 98%. Das Anomerverhältnis wurde mit Hilfe von ¹H-NMR-Spektroskopie zu $\alpha:\beta = 2:1$ bestimmt.

Die Acetalisierung von D-Glucose mit Benzylalkohol und saurem Kationentauscher erfolgte durch 5-stündiges Erhitzen auf 100°C. Der überschüssige Benzylalkohol konnte zusammen mit den gebildeten Furanosiden leicht mit Ether extrahiert werden. Das α,β -Benzylglucopyranosid (**1c**) wurde mit einer Ausbeute von 63% und einem Anomerverhältnis $\alpha:\beta = 4:3$ erhalten (S. 40, **Tab. 5**).



D-Galactose wurde als Suspension mit Allylalkohol und festem Kationentauscher bei 90°C 2h lang gerührt. Die Suspension wurde filtriert und der überschüssige Alkohol im Vakuum entfernt. Durch Extraktion mit Essigester konnten Nebenprodukte abgetrennt werden, die mittels NMR-Spektroskopie als Allyl-4,6-propyliden- α,β -galactopyranosid (**2a'**) sowie einem kleinen Anteil an Furanosiden (ca. 94 bzw. 6%) identifiziert werden konnten. Die Anomerverhältnisse $\alpha:\beta$ von Produkt **2a** und Nebenprodukt **2a'** waren hierbei 2/1 bzw. 1/1

(s.u. **Abb. III.1**). Das auf diese Weise gereinigte α,β -Allylgalactopyranosid (**2a**) wurde in einer Ausbeute von 74% isoliert. Unter den sauren Bedingungen der Umsetzung wird offenbar der Allylkohol teilweise isomerisiert und das entstandene Propanal reagiert mit den 4,6-Hydroxy-Gruppen der Galactose regioselektiv unter Acetalbildung.^[162]

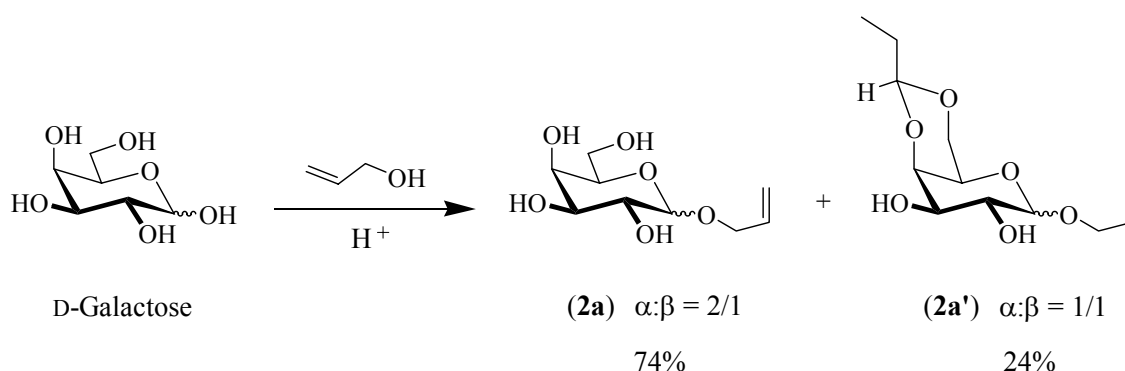
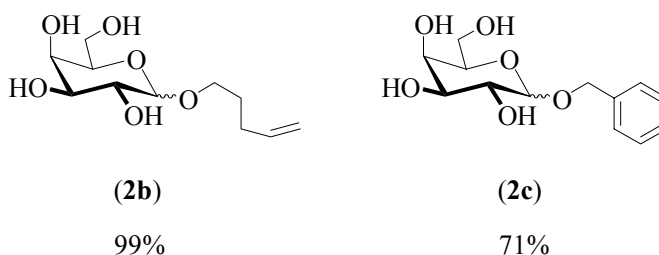


Abb. III.1 Saure Acetalisierung von D-Galactose mit Allylkohol.

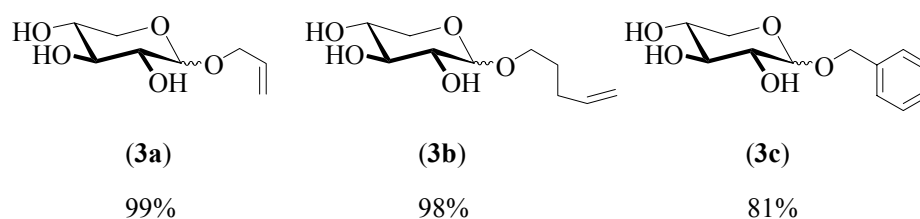
In einer weiteren Versuchsanordnung wurden D-Galactose und 4-Pentenol mit saurem Kationentauscher bei 90°C über 2h acetalisiert. Durch Extraktion mit Methylenchlorid wurde das 4-Pentenol wiedergewonnen. Die Reaktion lieferte zu 99% das Pent-4-enylgalactopyranosid (**2b**) mit einem Anomerverhältnis ($\alpha:\beta$) von 2:1.

Die Reaktion von D-Galactose mit Benzylalkohol bei 90°C lieferte das gewünschte α,β -Benzylgalactopyranosid (**2c**) in 71% Ausbeute mit einem Anomerenverhältnis von 4.9:2.1.



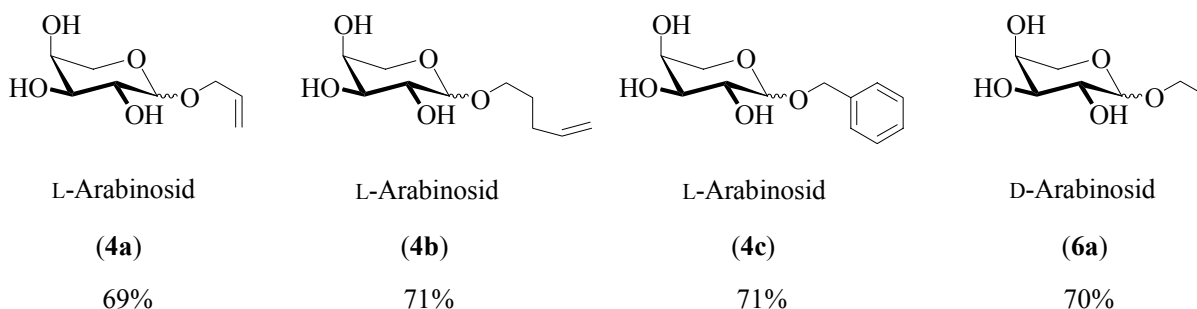
1.1.2. Acetalisierung von Pentosen

Die saure Acetalisierung von D-Xylose wurde ebenfalls mit Allylalkohol, 4-Pentenol und Benzylalkohol durchgeführt. Nachdem der feste Katalysator (Kationentauscher) abfiltriert und der Alkohol zusammen mit Furanosiden durch Extraktion mit Ether entfernt war, verblieben die gewünschten Pyranoside (**3a**, **3b** und **3c**) mit α,β -Verhältnissen von je ca. 2:1. Die Ausbeuten lagen hierbei zwischen 81 und 99%.



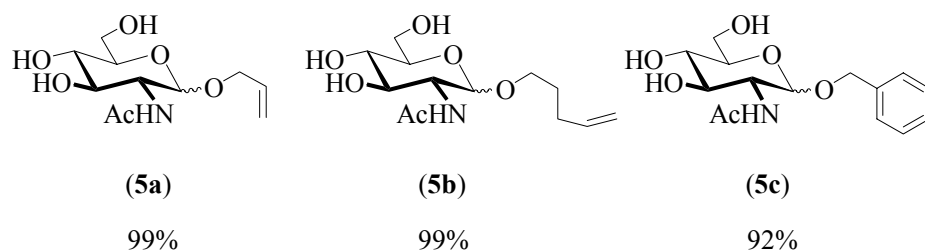
Nach saurer Umsetzung von L- und D-Arabinose mit Allylalkohol wurden die α,β -anomeren Gemische der jeweiligen Allyl-L- (**4a**) bzw. Allyl-D-arabinopyranoside (**6a**) in Ausbeuten von ca. 70% isoliert.

Für die Herstellung weiterer Arabinopyranoside aus freier L-Arabinose wurden die Reaktionen mit 4-Pentenol oder Benzylalkohol bei 90°C durchgeführt, wobei Pent-4-enyl- (**4b**) bzw. Benzyl-L-arabinosid (**4c**) mit $\alpha:\beta$ -Anomerverhältnissen von 1.8:3.1 und in Ausbeuten von jeweils 71% entstehen (S. 40, **Tab. 5**).



1.1.3. Acetalisierung von *N*-Acetyl-D-glucosamin

Für die Synthese der Pyranoside aus *N*-Acetyl-D-glucosamin wird die Umsetzung mit flüchtigem BF_3 -Etherat und Allylalkohol über 2h bei 100°C durchgeführt. Von *Lee* und Mitarbeiter wurde zur Acetalisierung von *N*-Acetyl-D-glucosamin und Allylalkohol Ionentauscher (H^+ -Form) oder BF_3 -Etherat eingesetzt, wobei sauberere Umsetzung sowie höhere Menge der Pyranoside mit der schwachen Lewis-Säure (BF_3 -Etherat) erhalten wurde.^[30] Der überschüssige Alkohol und Katalysator wurden im Vakuum entfernt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch durch Extraktion mit Ether gereinigt. Man erhielt das Allyl-2-acetamido-2-desoxy- α,β -D-glucopyranosid (**5a**) in einem α,β -Verhältnis von 4.3:2.7 und einer Ausbeute von 99%. Auf dieselbe Weise wurde GlcNAc mit 4-Pentenol bzw. Benzylalkohol acetalisiert. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung mit Anionentauscher (Cl^- -Form) neutralisiert und filtriert. Der überschüssige Alkohol wurde durch Extraktion mit Ether entfernt. Die einfachen Glycoside Pent-4-enyl- und Benzyl-2-acetamido-2-desoxy- α,β -D-glucopyranosid (**5b** bzw. **5c**) konnten so in Ausbeuten von 99 bzw. 92% isoliert werden.



1.1.4. Acetalisierung von L-Fucose

Eine saure Lösung von L-Fucose (6-Desoxy-L-galactose) und Allylkohol wurde bei 90°C über 1h gerührt. Die Reaktion lieferte zu 19% die Furanoside und zu 80% die gewünschten Pyranoside (**7a**) in einem α,β -Verhältnis von 2:1.

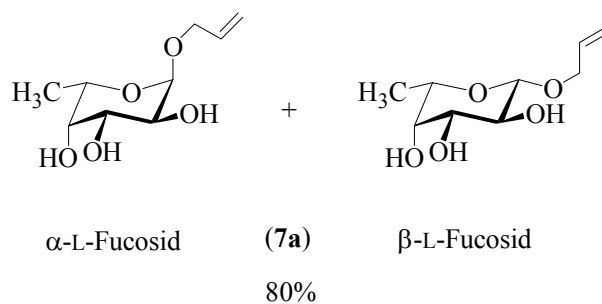


Tabelle 5 Isomere Glycopyranoside durch Acetalisierung nach der *Fischer-Reaktion*.

Monosaccharid	Maßstab (mmol)	Alkohol	T (°C)	RD (h)	Anomerverhältnis α/β	P	Ausbeute (%)	Maßstab (g)
D-Glucose	139	Allylalkohol	90	2	4.5:2.5	1a	96	29.4
D-Glucose	11	4-Pentenol	90	1	2:1	1b	98	2.7
D-Glucose	139	Benzylalkohol	100	5	4:3	1c	63	23.7
D-Glucose	1665	Ethanol	80	16	2:1	1d	99	343.2
D-Glucose	2.8	1-Docosanol	65	24	1:2	1e	87	1.2
D-Galactose	138	Allylalkohol	90	2	2:1	2a	74	22.5
D-Galactose	11	4-Pentenol	90	2	2:1	2b	99	2.7
D-Galactose	28	Benzylalkohol	90	2	4.9:2.1	2c	71	5.4
D-Xylose	67	Allylalkohol	90	2	2:1	3a	99	12.6
D-Xylose	6.7	4-Pentenol	90	2	2:1	3b	98	1.4
D-Xylose	67	Benzylalkohol	80	20	2:1	3c	81	13
L-Arabinose	6.7	Allylalkohol	90	1	1.5:3.2	4a	69	0.9
L-Arabinose	6.7	4-Pentenol	90	1	1.8:3.1	4b	71	1.0
L-Arabinose	6.7	Benzylalkohol	90	1	1.8:3.1	4c	71	1.1
GlcNAc	45	Allylalkohol	100	2	4.3:2.7	5a	99	11.8
GlcNAc	4.5	4-Pentenol	100	2	6:1	5b	99	1.3
GlcNAc	27	Benzylalkohol	100	2	2:1	5c	92	7.7
D-Arabinose	3.3	Allylalkohol	90	1	3:2	6a	70	0.4
L-Fucose	3	Allylalkohol	90	1	2:1	7a	80	0.5

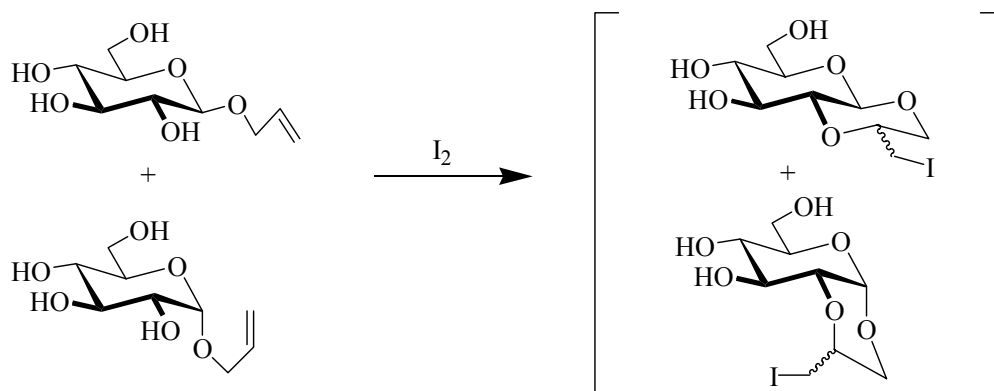
a: Lösung von D-Glucose in einem Gemisch von DMF/CH₂Cl₂ (v:v 1/1).

2.1. Enzymatische partielle Hydrolyse

2.1.0. Enzymatische partielle Hydrolyse von α,β -Allyl-D-glucosiden

Für methodische Studien wurden zunächst die Allylglucoside (**1a**) herangezogen, um die hydrolytische Funktion der α - und β -Glucosidasen zu testen. Hierbei bestand jedoch die Problematik, dass die Hydrolyse eines bestimmten Anomers durch DC nicht verfolgt werden konnte, weil α - und β -Anomere dünnschichtchromatographisch praktisch identisches

Laufverhalten zeigten und daher nicht unterschieden werden können. HPLC-Analytik ist bei den Glycosiden mit aliphatischen Aglyconresten kaum praktikabel, da mangels eines UV-Chromophors die Detektion unsicher ist. Um das Retentionsverhalten durch Änderung der Molekülform spezifisch zu beeinflussen wurde daher versucht, eine intramolekulare Cyclisierung der Doppelbindung des Aglycons zu der 2 OH-Gruppe zu erzielen und damit cis/trans-isomere Bicyclen mit eindeutiger stereochemischer Korrelation zur anomeren Konfiguration zu erzeugen. Hierzu wurden verschiedene Elektrophile mit dem Gemisch der Allylglucoside getestet. Mit Quecksilber-(II)-acetat in Methanol erfolgte in einer Zeitspanne von 5 Minuten vollständige Reaktion bei Raumtemperatur, woraufhin allerdings eine NaBH_4 -Reduktion erforderlich ist,^[36] da das Metall ein Eluieren bei der DC verhindert.^[38] Vollständiger Umsatz konnte ebenso mit drei Äquivalenten NBS in DMSO in 15 Minuten oder mit Jod in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{DMSO}$ (10:4) nach 20h beobachtet werden.^[163] Leider konnte mit keiner dieser Verfahrensweisen eine sichere Differenzierung der isomeren Bicyclen mittels DC erzielt werden. Daher wurde in Folgenden generell die NMR-Spektroskopie zur Reaktionskontrolle herangezogen, die eine sichere Analyse zum Ermitteln der Zusammensetzung partieller Hydrolysate von anomeren α,β -Allylglucosiden mit Glucosidasen erlaubt.^[164-165]



Für die spezifische Hydrolyse des β -Anomers ausgehend von den α,β -Allylglucosiden (**1a**) wurde die preiswerte β -Glucosidase aus Mandeln (EC 3.2.1.21) gewählt.^[131] Für die Bestimmung des optimalen pH-Werts wurden zunächst verschiedene Phosphat gepufferte Lösungen (pH von 5 bis 7.8) mit 0.1 mmol α,β -Allylglucosid und einer größeren Menge der β -Glucosidase (116 U/mmol Substrat) inkubiert. Während 24h Rühren bei RT wurde mittels DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 17:3) der Reaktionsverlauf kontrolliert. Nur bei pH-Werten zwischen 5.0 bis 5.7 wurde das Aglycon erfolgreich abgespalten. Die vollständige Hydrolyse des β -Anomers wurde mittels ^1H -NMR gesichert.

Bei einem pH von 5.7 wurde dann die erforderliche Mindestmenge an β -Glucosidase für die vollständige Hydrolyse des β -Anomers bestimmt. Dazu wurden ansteigende Mengen des Enzymes von 1 bis 15 U/mmol Substrat in wässrigen gepufferten Lösungen von α,β -Allylglucosid (0.1 mmol) bei RT inkubiert. Um das Ausmaß der partiellen Hydrolyse zu bestimmen, wurden in Zeitabständen von 24h kleine Proben aus der Reaktionslösung zur Denaturierung des Enzymes kurz auf 80°C erhitzt und danach ^1H -NMR-spektroskopisch analysiert (s.u. **Abb. III.2**).

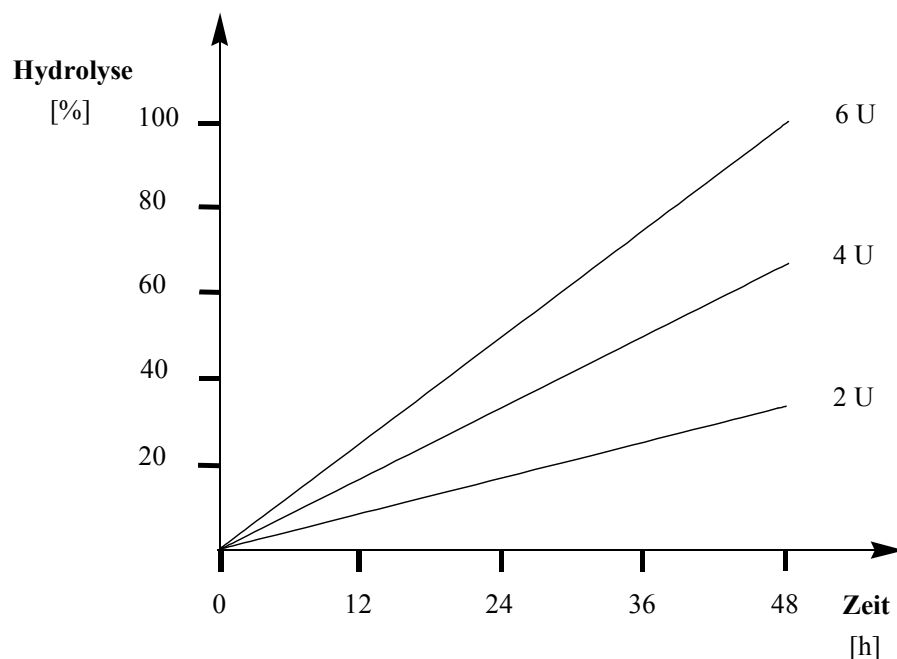


Abb. III.2 Bestimmung der minimalen Menge der β -Glucosidase aus Mandeln (U/mmol Substrat) zur vollständigen Hydrolyse des β -Anomers von α,β -Allylglucosid.

Nach der Bestimmung des optimalen pH-Wertes und der adäquaten Menge an Enzym zur vollständigen Hydrolyse des β -Anomers (6 U/mmol) in 48h wurde die Umsetzung im präparativen Maßstab durchgeführt, wobei 31.8 mmol α,β -Allylglucosidgemisch mit β -Glucosidase umgesetzt wurden. Nach 2d wurde die vollständige Umsatz des β -Anomers spektroskopisch verifiziert. Das Lösungsmittel mit dem freien gesetzten Allylalkohol wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand erst aus Ethanol, dann aus Aceton umkristallisiert. Auf diese Weise wurde reines α -Allyl-D-glucopyranosid (**α -1a**) in 64% absoluter, sowie 100% relativer Ausbeute gewonnen (S. 63 **Tab. 6**, Eintrag 4).

Die absoluten Ausbeuten sind durch die Zusammensetzung der Ausgangsmaterialien begründet. Für die relative Ausbeute werden nur die am Anfang vorhandene relativen Anteile an α - oder β -Glycosiden im Anomergemisch betrachtet, die durch die jeweilige Glycosidase tatsächlich umgesetzt werden können (**Tabelle 6**).

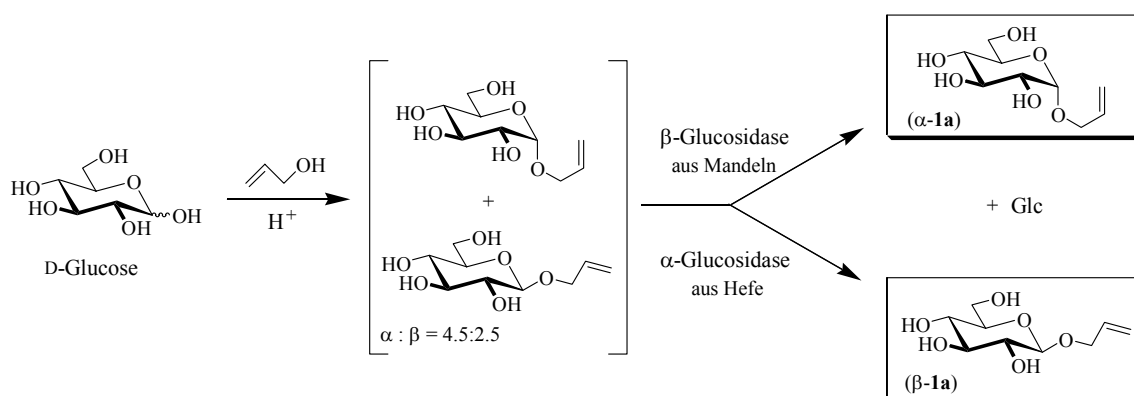


Abb. III.3 α -Allyl- (**α -1a**) und β -Allylglucosid (**β -1a**) durch chemische Acetalisierung sowie enzymatischer Differenzierung mit β - bzw. α -Glucosidase.

Für die komplementäre vollständige Hydrolyse des α -Anomers wurde die kommerzielle α -Glucosidase aus Hefe (EC 3.2.1.20) verwendet, die wie die β -Glucosidase aus Mandeln gut charakterisiert ist. Nach der gleichen Vorgehensweise wie für die β -Glucosidase wurde in diesem Fall ein optimaler pH-Wert von 6.8 sowie die erforderliche Menge an Enzym bestimmt. Nach Festlegung der optimalen Bedingungen wurde die α,β -anomere Mischung des Allylglucosids (0.9 mmol) mit α -Glucosidase (250 U/mmol) 48h bei RT inkubiert. Für diesen präparativen Maßstab eignete sich eine einfache chromatographische Trennung über Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH, 17:3), um reines β -Allyl-D-glucosid (**β -1a**) in einer absoluten und

relativen Ausbeute von 35 bzw. 100% (**Abb. III.3**) zu erhalten. Durch ^1H -NMR-Spektroskopie wurde die Qualität des Glucosids (β -**1a**) bestimmt (s.u. **Abb. III.4**).

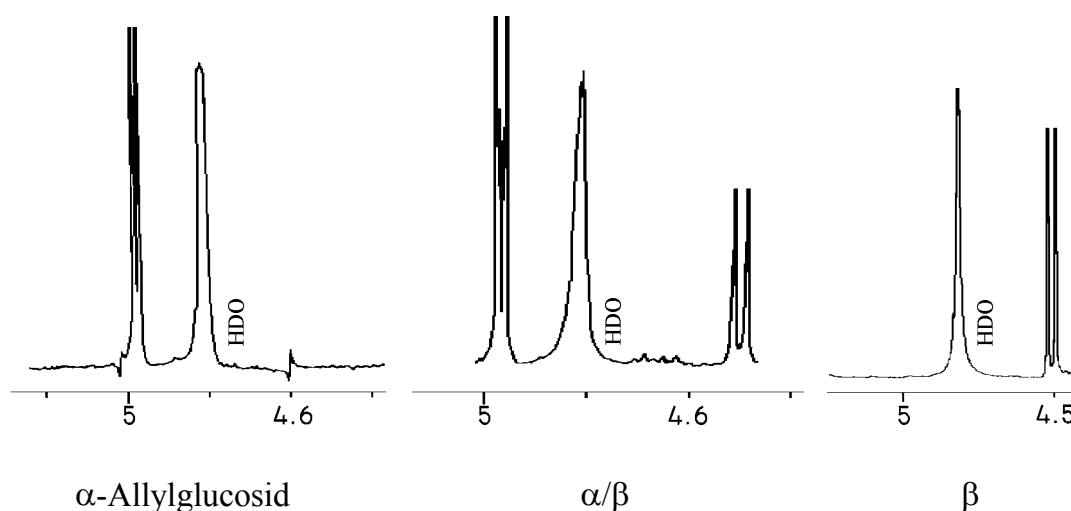


Abb. III.4 ^1H -NMR-Signale (300 MHz; D_2O) des anomeren Protons (am C-1) bei der Mischung des α - und β -Isomers (Mitte) und von reinem α -Allylglucosid (links) bzw. reinem β -Allylglucosid (rechts).

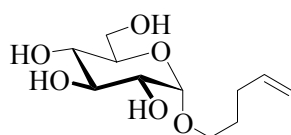
2.1.1. Enzymatische partielle Hydrolyse von α,β -Pent-4-enyl-D-glucosiden

Nachdem die Hydrolyse mit α,β -Allylglucosiden erfolgreich verlaufen war, wurden gleichartige Versuche zur Differenzierung von α,β -Pent-4-enylglucosiden (**1b**) durchgeführt.

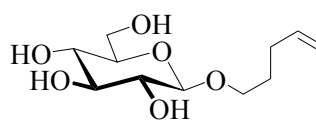
Für die partielle Hydrolyse der α,β -Pent-4-enylglucoside (6.8 mmol) waren wie bei den analogen Allylglucosiden 6U β -Glucosidase je mmol Substrat erforderlich. Der freigesetzte

Alkohol wurde aus der wässrigen Lösung mit Ether extrahiert. Das teure 4-Pentenol konnte auf diese Weise mit ca. 91% Ausbeute wiedergewonnen werden. Das verbliebene α -Pent-4-enylglucosid (α -**1b**) wurde erst aus Ethanol, dann aus Aceton umkristallisiert und in absoluter und relativer Ausbeute von 66 bzw. 100% erhalten.

Mit α -Glucosidase aus Hefe wurde das Anomerengemisch **1b** in gepufferter Lösung (pH 6.8) hydrolysiert, wofür auch 250 U/mmol Substrat des Enzyms erforderlich waren. Im Vergleich zu β -Glucosidase war größere Menge der α -Glucosidase (40U Enzym mehr pro mmol Substrat) für die partielle Hydrolyse notwendig. Nach einer chromatographischen Reinigung wurde das β -Pent-4-enyl-D-glucosid (β -**1b**) in absoluter und relativer Ausbeute von 30 bzw. 100% gewonnen.

(α -**1b**)

66%

(β -**1b**)

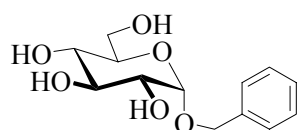
30%

2.1.2. Enzymatische partielle Hydrolyse von α,β -Benzyl-D-glucosiden

Anders als bei den α,β -Allyl- und α,β -Pent-4-enyl-glucosiden kann man die partielle Hydrolyse von α,β -Benzylglucosid mittels DC (EE/Isopropanol/Wasser, 9:4:2) verfolgen. Die vollständige Hydrolyse des β -Anomers erfolgte innerhalb von 24h bei einem pH-Wert von 5.7 mit 6U β -Glucosidase/mmol Substrat. Nachdem der Benzylalkohol mit Ether extrahiert war,

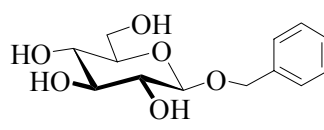
wurde der Rückstand durch Umkristallisation aus Aceton gereinigt. Die Ausbeute an der gewünschten Verbindung (α -**1c**) belief sich auf 55%.

Die Hydrolyse des α -Anomers fand mit 370 U α -Glucosidase/mmol Substrat in 2d statt. Für die partielle Hydrolyse mit β -Glucosidase waren 60U Enzym weniger pro mmol Substrat erforderlich. Nach einer chromatographischen Reinigung erhielt man das β -Benzyl-D-glucosid (β -**1c**) in absoluter Ausbeute von 42% (S. 63 **Tab. 6**, Eintrag 3).



(α -**1c**)

55%



(β -**1c**)

42%

2.1.3. Einfache Reinigung des β -D-Glucosids mittels RP-Chromatographie

Die α -Glucoside wurden zwar im Grammaßstab hergestellt und konnten durch Umkristallisation gereinigt werden, die Synthese der β -Glucoside war dagegen wegen der Notwendigkeit von höheren Katalysatormengen und damit aus Kostengründen auf kleine Maßstäbe begrenzt. Da zur Reinigung die Umkristallisation von kleinen Mengen verlustreich und daher wenig geeignet ist, mußte die Reinigung durch Chromatographie an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 17:3) erfolgen.

Speziell die Verwendung von Reversed-Phase-Kieselgelen versprach die Option einer einfacheren gruppenspezifischen Abtrennung der β -Glucoside. Unter Ausnutzung der hydrophoben Eigenschaften von einigen der Aglycone könnten Glucosid-Träger dann einfach gereinigt werden, wenn das RP-Kieselgel diese unpolaren Aglycone adsorbiert. Freie, hydrophile Glucose und Phosphatsalze könnten durch Spülen der Säule mit Wasser leicht eluiert werden. Das adsorbierte Produkt sollte anschließend durch Elution mit einem weniger polaren Laufmittel getrennt erhalten werden können.

Diese Variante der Reinigungsmethode ließ sich in der Tat bei den Glucosiden mit ausreichend hydrophoben Aglyconen wie den 4-Pentenyl- und Benzyl-Resten anwenden. So wurde eine gepufferte Lösung von α,β -Pent-4-enylglucosid mit α -Glucosidase (250 U/mmol) inkubiert und nach der erfolgten partiellen Hydrolyse das freie 4-Pentenol mit Ether extrahiert. Die Lösung wurde daraufhin über eine kurze RP-Kieselgelsäule filtriert und mit Wasser nachgespült, woraufhin sowohl die Glucose als auch der Phosphat-Puffer vollständig herausgewaschen wurde. Durch Wechsel des Elutionsmittels auf Ethanol wurde reines β -Pent-4-enylglucosid in relativer Ausbeute von 93% von der Säule eluiert.

Wegen der hohen Kosten von RP-Kieselgel ist die Regenerierung zur wiederholten Verwendung von Interesse. Dies kann durch einfaches Spülen der Säule mit Ethanol und Wasser erreicht werden.

Dieselbe Trennmethode wurde auch mit β -Benzylglucosid getestet. Eine gepufferte Lösung des α,β -Benzylglucosids wurde mit α -Glucosidase (370 U/mmol) 1d lang inkubiert. Nach der Extraktion von freiem Benzylalkohol mit Ether wurde die Lösung über die RP-Kieselgelsäule

gegeben. Nach Waschen mit Wasser und Elution mit Ethanol wurde das gewünschte β -Benzylglucosid in relativer Ausbeute von 97% und mit hoher Reinheit gewonnen.

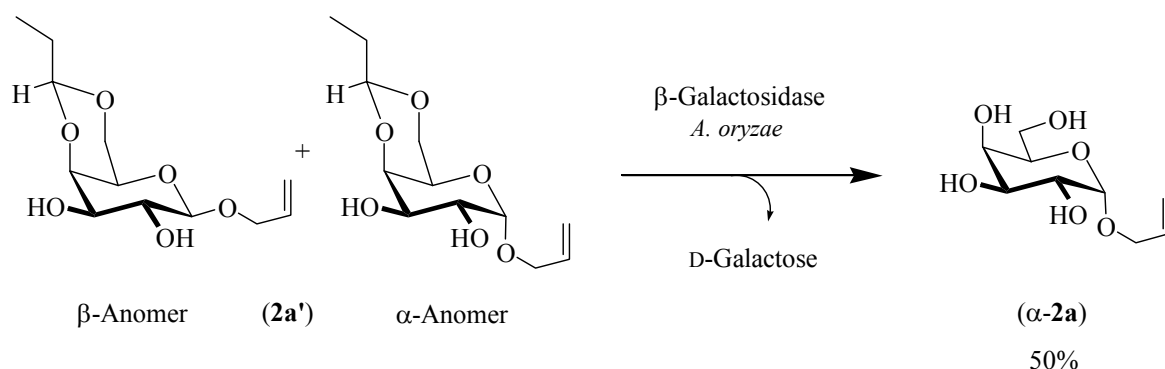
2.1.4. Partielle Hydrolyse von α,β -Allyl-D-galactosiden

Wie die Glucosidasen gibt es auch mehrere kommerzielle Galactosidasen, die spezifisch für den Galactosyl-Transfer in der Synthese einfacher Galactoside und Oligosaccharide durch Umkehr-Hydrolyse und Transglycosylierung verwendet werden können. Beispielsweise wurden bereits die β -Galactosidasen aus *Aspergillus oryzae* und *Escherichia coli* (EC 3.2.1.23) für die Synthese des β -Pent-4-enylgalactosids bzw. β -Allylgalactosids eingesetzt.^[131,140] Die β -Galactosidase aus *A. oryzae* ist besonders preiswert erhältlich und für die anomere Differenzierung eines Galactosidgemisches anwendbar.

Zunächst wurde das α,β -Allylgalactosidgemisch in kleinen Screening-Ansätzen mit dem Enzym inkubiert, um dem gleichen Verfahren wie beim Glucosidgemisch den optimalen pH-Wert (4.5) und die Mindestmenge an Enzym (72U pro mmol Substrat in 48h) zu ermitteln. Die Teilhydrolyse konnte hier mittels DC-Kontrolle (EE/Isopropanol/Wasser, 9:4:2) verfolgt werden. Ein präparativer Ansatz wurde mit 31.8 mmol α,β -Allyl-D-galactosid unter Verwendung der β -Galactosidase aus *A. oryzae* durchgeführt, wobei nach Umkristallisation aus Ethanol das unverbrauchte α -Allylgalactosid (α -**2a**) in absoluter Ausbeute von 66% gewonnen wurde.

Da Glycosidasen spezifisch bezüglich der räumlichen Struktur des Glycosids sind, ist es eher unwahrscheinlich, daß die β -Galactosidase die glycosidische Bindung im Nebenprodukt Allyl-4,6-*O*-propyliden- α,β -D-galactopyranosid (**2a'**) spezifisch hydrolysieren kann.

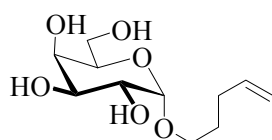
Verbindung **2a'** war in Zuge der Acetalisierung von Galactose mit Allylalkohol in Anomerenverhältnis $\alpha:\beta = 1:1$ gebildet worden. Erstaunlich ist, daß eine gepufferte Lösung dieses Anomerengemischs (**2a'**) bei Inkubation mit β -Galactosidase (190 U/mmol Substrat) bei pH 4.5 und RT einen Umsatz zeigte. Per DC (EE/Isopropanol/Wasser, 9:4:2) konnte die Bildung von freier Galactose sowie α -Allyl-D-galactosid (α -**2a**) nachgewiesen werden. Das Isomer α -**2a** wurde nach chromatographischer Aufreinigung in 50% absoluter Ausbeute erhalten. Da aus mechanistischen Erwägungen eine Enzymkatalyse der Hydrolyse des Propylidenacetals ausgeschlossen werden kann, muß davon ausgegangen werden, daß letzteres unter den sauren Reaktionsbedingungen instabil ist und die Spontanhydrolyse von **2a'** zu **2a** die ausschließende enzymatische Anomerendifferenzierung erlaubt.



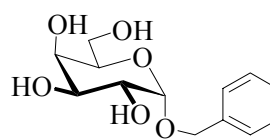
Die partielle Hydrolyse des Rohgemischs aus der *Fischer-Acetalisierung*, das **2a** und **2a'** enthält, lieferte das α -Allyl-D-galactosid direkt in einer Ausbeute von 58%.

2.1.5. Partielle Hydrolyse von α,β -Pent-4-enyl- und α,β -Benzyl-D-galactosiden

In weiteren Umsetzungen wurden α,β -anomere Gemische von Pent-4-enyl-D-galactosid (**2b**) und Benzyl-D-galactosid (**2c**) mit derselben β -Galactosidase (72 U/mmol) in wässrigem Puffer bei pH 4.5 inkubiert. Nach der Wiedergewinnung des Alkohols durch Extraktion mit Ether wurden die Rückstände durch Umkristallisation aus Aceton bzw. Ethanol, dann Aceton gereinigt. α -Pent-4-enylgalactosid (α -**2b**) bzw. α -Benzylgalactosid (α -**2c**) fielen dabei in absoluten Ausbeuten von 66 und 69% an (S. 63 **Tab. 6**, Einträge 12-13).



(α -**2b**)
66%



(α -**2c**)
69%

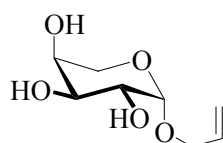
2.1.6. Partielle Hydrolyse mit roher β -Galactosidase

Crout et al. fanden in dem kommerziell angebotenen rohen Präparat der β -Galactosidase aus *A. oryzae* eine reiche Quelle für mehrere andere Glycosidasen, die durch routinemäßige Verfahren gereinigt und dann jeweils separat genutzt werden können.^[166] Für unsere Zwecke wäre jedoch prinzipiell die Reinigung individueller Enzymkomponenten mit hoher Spezifität dann unnötig, wenn Enzyme mit konkurrierender Hydrolyse-Aktivität für das jeweils anomere Paar der Glycoside abwesend wäre, oder nur mit sehr geringer relativer Aktivität wirkt. Tatsächlich konnte die rohe β -Galactosidase-Aktivität bereits für die Hydrolyse mit hoher

Selektivität genutzt werden, obwohl das Präparat nachweislich auch geringe Mengen an α -Galactosidase enthält.^[166]

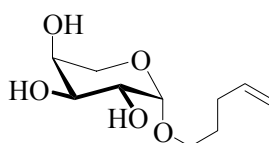
2.1.7. Partielle Hydrolyse von α,β -L-Arabinosiden

L-Arabinoside ähneln in ihrer konfigurativen Anordnung der Hydroxylgruppen den D-Galactosiden, nur fehlt ihnen der CH_2OH -Substituent in der Pyranoseform. Bei entsprechender Substrattoleranz der β -Galactosidase sollten demnach auch die strukturell korrespondierenden L-Arabinoside hydrolytisch differenzieren lassen. Erste Test mit dem Anomerengemisch des Allylarabinosids zeigten, daß tatsächlich die selektive Hydrolyse des α -Anomers bei pH 4.5 innerhalb von 3d stattfand. In diesem Fall waren 605 U Proteinmengen entsprechend β -Galactosidase/mmol Substrat erforderlich. Ebenso wurden die anomeren Mischungen von Pent-4-enyl- und Benzylarabinosid mit roher β -Galactosidase erforderlich inkubiert. Nach üblicher Extraktion zur Rückgewinnung des Alkohols und Kristallisation wurden die entsprechenden β -L-Arabinoside (β -4a, β -4b und β -4c) in absoluten Ausbeuten von ca. 45% gewonnen. Die β -Pent-4-enyl- und β -Benzyl-L-arabinoside können vorteilhafter auch durch RP-Chromatographie gereinigt werden, wobei der freie Zucker durch wässrige Elution wiedergewonnen werden kann.



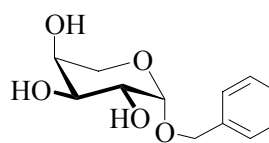
(β -4a)

46%



(β -4b)

45%



(β -4c)

45%

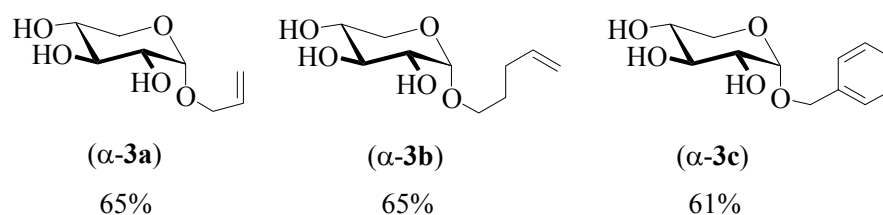
An dieser Umwandlung ist bemerkenswert, dass trotz vermutlicher hydrolytischer Wirkung der β -Galactosidase die β -konfigurierten Arabinopyranoside unreaktiv sind und als Reaktionsprodukt erhalten werden. Die Tatsache, daß die β -Galactosidase die α -Arabinoside spaltet, ist lediglich eine Konsequenz aus der Kohlenhydrat-Nomenklatur, da sich die stereochemische Referenz in der Zugehörigkeit zur D- und der L-Reihe ändert was auch die anomere Konfiguration invertiert.

Anders als mit den positiv verlaufenen Synthesen der L-Arabinoside blieben jedoch alle unsere Versuche zur partiellen Hydrolyse von α,β -Allyl-D-arabinosiden (**6a**) mit rohen Präparaten der β -Galactosidase aus *A. oryzae* erfolglos.

2.1.8. Partielle Hydrolyse von α,β -D-Xylosiden

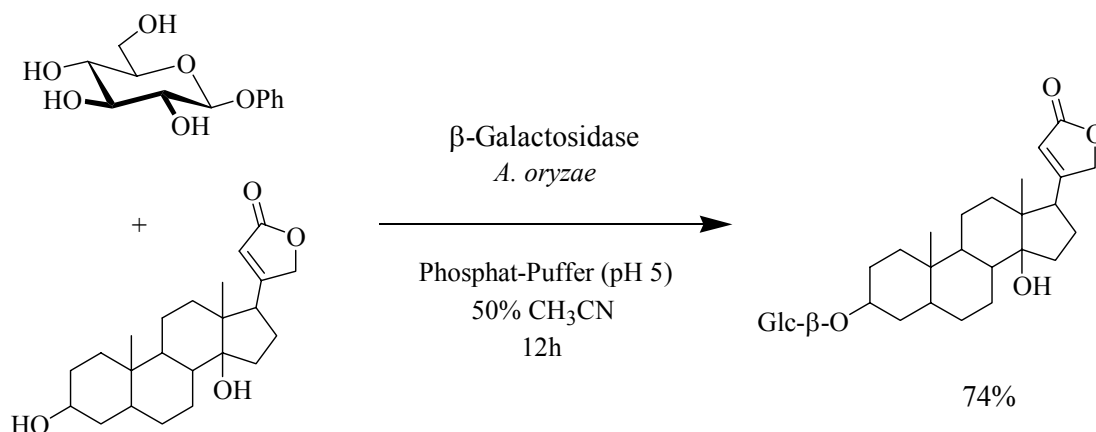
Mit der Annahme, daß das Rohpräparat von β -Galactosidase aus *A. oryzae* auch Nebenaktivitäten an Xylosidasen enthält (bzw. Glucosidasen mit einer gewissen Substrattoleranz für strukturell eng verwandte Xyloside), wurde die Hydrolyse der Xyloside bei einem geeigneten pH-Wert (4.5) mit einer Proteinmenge von nominell 560U β -Galactosidase pro mmol Substrat bei 37°C getestet. Tatsächlich konnte DC-analytisch ein teilweiser Umsatz beobachtet werden. Aus präparativen Ansätzen mit anomeren Mischungen der Xyloside **3a-3c** mit dem rohen Enzym wurde zunächst der Alkohol mit Ether extrahiert und die Rückstände NMR-spektroskopisch analysiert. Da weitgehend reine α -Anomere vorlagen, wurde aus Aceton umkristallisiert. Alle drei α -Xyloside, α -Allylxylosid (α -**3a**), α -Pent-4-enylxylosid (α -**3b**) und α -Benzylxylosid (α -**3c**) konnten in absoluten Ausbeuten von

mehr als 60% rein isoliert werden (S. 63 **Tab. 6**, Einträge 14-16). Da dies praktisch quantitativ den relativen Anteilen der α -Anomere im Eduktgemisch entspricht, kann davon ausgegangen werden, daß die verwendete Enzympräparation nur β -Xylosidaseaktivität, aber keine α -Xylosidase enthielt.

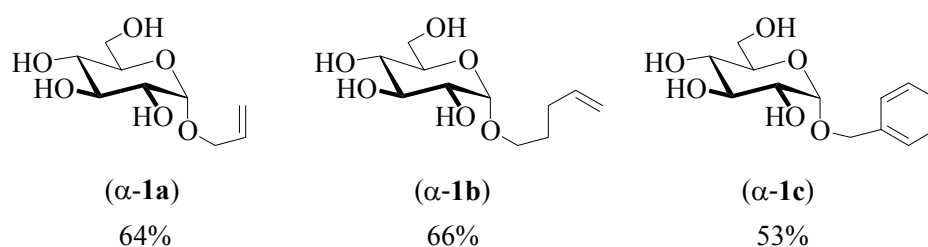


2.1.9 Partielle Hydrolyse von α,β -D-Glucosiden

Bereits die Hydrolyse von β -Xylosiden gab Anlaß zu Spekulationen, daß der aktive Katalysator möglicherweise eine β -Glucosidasekomponente im Rohpräparat war mit einer gewissen Substratflexibilität. Auch *Ooi et al.* hatten die Synthese von verschiedenen Alkyl- und Steroyl- β -D-glucosiden beschrieben durch Transglycosylierung mit einer großen Menge an roher β -Galactosidase aus *A. oryzae* in wässriger (organischer) Lösung bei pH 5.^[167] Es lag daher nahe, diese Rohpräparation auch anstelle der gereinigten Glucosidasen (vgl. Kap. 2.1.0.-2.1.2.) zu testen.

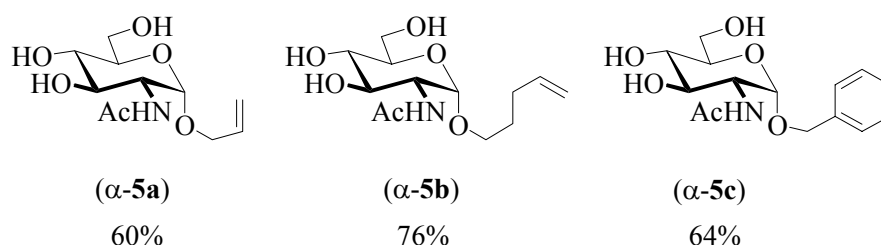


Die partielle Hydrolyse der α,β -Glucoside (**1a-c**) wurde daher mit roher β -Galactosidase untersucht, wobei die Substrate in wässriger Phosphat-Lösung (120 mM) mit nominellen 560 U/mmol Enzym bei pH 4.5 inkubiert wurden. Tatsächlich wurde unter diesen Bedingungen nach 2d eine vollständige Hydrolyse der β -Anomeren erreicht, wie die NMR-Analyse des Rohprodukts ergab. Auf diese Weise wurden Allyl- (α -**1a**), 4-Pentenyl- (α -**1b**), und Benzyl- α -D-glucoside (α -**1c**) in mehr als 50% absoluter Ausbeute erhalten (S. 63 **Tab. 6**, Einträge 8-10).



2.1.10 Partielle Hydrolyse von *N*-Acetyl- α,β -D-glucosaminosiden

Das rohe Proteinpräparat aus *A. oryzae* weist bekanntermaßen auch Hexosaminosidase-Aktivität auf.^[166] Die optimalen Bedingungen der partiellen Hydrolyse wurden zunächst für das α,β -Allylglucosaminosid (**5a**) bestimmt und dann in präparativem Maßstab für die Anomerengemische von Allyl-, Pent-4-enyl- und Benzylglucosaminosid angewendet. Wie bei den Xylosiden waren große Mengen an Enzym (560 U/mmol) sowie eine verlängerte Reaktionsdauer auf 3d bei pH 4.5 erforderlich. Der jeweils freigesetzte Alkohol wurde mit Ether extrahiert und die Rückstände umkristallisiert. Reine Allyl-, Pent-4-enyl- und Benzyl- α -D-glucosaminoside (α -**5a**, α -**5b** bzw. α -**5c**) konnten so in mehr als 60% absoluter Ausbeute erhalten werden.



Ursprünglich waren für die eingangs beschriebenen Versuche im Arbeitskreis vorhandene Restbestände eines kommerziellen Rohpräparats der β -Galactosidase aus *A. oryzae* verwendet worden, das später jedoch nicht mehr auf dem Markt erhältlich war (Sigma; Präp. G-7138). Weitere Untersuchungen wurden daher mit einem Nachfolgeprodukt des Herstellers (Sigma, Präp. G-5160) durchgeführt. Zur Sicherung der Vergleichbarkeit bisheriger Resultate mußten zunächst die obigen Experimente repräsentativ mit dem neuen Präparat wiederholt werden.

Dabei zeigte sich, daß mit Ausnahme der Umsetzung von Alkylxylosiden das Ersatzpräparat gleichwertig und kompatibel war zu allen den oben beschriebenen Anwendungen.

2.1.11. Weitere Versuche mit rohen Glycosidasen

Komplementär zu den Synthesen von reinen α -Galactosiden aus entsprechenden Anomerengemischen durch partielle Hydrolyse mit einer β -Galactosidase wurde auch die Hydrolyse des β -Anomers des Allylgalactosids (**2a**) mit einer α -Galactosidase versucht. Weil reine α -Galactosidasen wie z.B. die aus Kaffeebohnen oder *A. niger* vergleichsweise sehr teuer sind, aber nach Literaturangaben auch als Nebenkompente in anderen Glycosidasepräparationen zu finden sind, sollten zur partiellen Hydrolyse der α -Allyl-, Pent-4-enyl- und Benzyl-D-galactoside diese Rohenzyme auf ihre präparative Verwendbarkeit hin getestet werden.

Untersuchung von *Crout et al.* hatten Aktivitäten von α -Galactosidase in den rohen Präparaten „Ficin“ aus dem Gummibaum (*Fig Tree Latex*) und der β -Glucuronidase aus Rindsleber gezeigt, welche an Allyl- α,β -galactosid (**2a**) getestet wurden.^[166] Für die Ermittlung des optimalen pH-Werts wurde das Anomergemisch mit großen Mengen jedes dieser kommerziellen Präparate umgesetzt, wobei Lösungen von α,β -Allylgalactosid (22 mM) mit pH-Werten von 4.5 bis 7 mit rohem Ficin sowie mit β -Glucuronidase bei 37°C inkubiert wurden. Die Reaktionen wurden mittels DC verfolgt, allerdings konnte auch bei längeren Reaktionszeiten keine Hydrolyse nachgewiesen werden.

Eine Vergleichbare Situation ergab sich auch in Falle der literatur-beschriebenen Aktivität von α -Fucosidase in partiell gereinigten Präparaten von β -Glucuronidase aus Rindsleber

sowie aus *Scallop-Muscheln* (*Chlamys opercularis*), wofür das Anomergemisch von α,β -Allylfucosid (**7a**) keine partielle Hydrolyse festzustellen war.

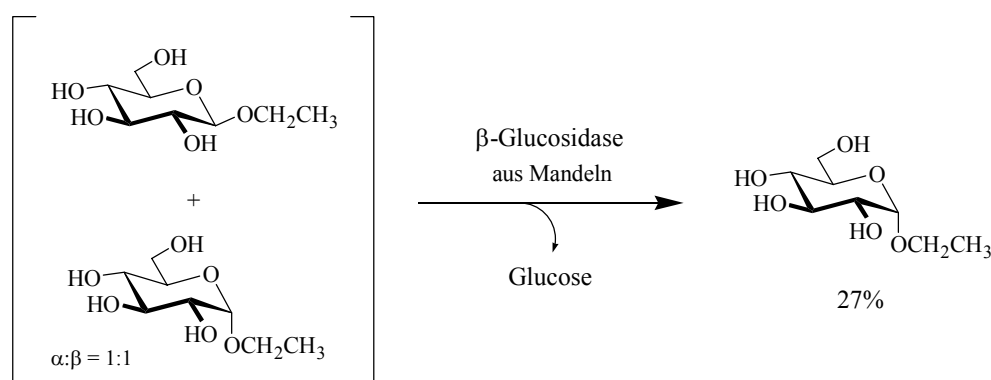
Möglicherweise waren die beschriebenen Aktivitäten so gering, daß die Nachweisgrenze in unserer Versuchsanordnung unterschritten war, oder die Enzyme lagen im Gemisch in deaktivierter Form vor. Eine Aufreinigung wurde allerdings nicht versucht.

3.1. Synthese von α -Ethyl-D-glucopyranosid

Horikoshi et al. fanden für das japanische Getränk Sake eine positive Wirkung gegen UVB-Strahlungen und konnten zeigen, daß dieser Effekt auf den Bestandteil α -Ethylglucosid zurückzuführen war. Das entsprechende β -Glucosid erwies sich als völlig inaktiv.^[168] Die Synthese der Japaner wurde durch Acetalisierung von D-Glucose mit Ethanol nach *Fischer* unter Ionentauscher-Katalyse (H^+ -Form) eingeleitet und das entstandene Anomergemisch konventionell nach Peracetylierung chromatographisch getrennt. Die peracetylierten α -Ethyl- und β -Ethylglucopyranoside konnten hierbei mit 45 bzw. 30% Ausbeute erhalten werden. Durch Entschützen mit 1M NaOEt wurden schließlich die reinen α - und β -Isomere gewonnen.

Wegen dieser und feuchtigkeitskonservierender Eigenschaften ist α -Ethylglucosid für die Herstellung von Kosmetika von Interesse. Anders als die klassisch-chemische Synthesesequenz würde die enzymatische Differenzierung der anomeren Mischung hierbei einen saubereren und vermutlich kostengünstigeren Herstellungsprozess darstellen.

Björkling et al. hatten bereits die teilweise Hydrolyse eines Anomergemisch ($\alpha:\beta = 1:1$) mit β -Glucosidase aus Mandeln beschrieben. Die Umsetzung war mit 166 mmol Substrat in einem Acetat-Puffer (pH 4.5) durchgeführt worden. Allerdings waren die Rückstände chromatographisch aufgereinigt worden, wobei α -Ethyl-D-glucosid in absoluter Ausbeute von 27% erhalten wurde.^[169]



Die hydrolytische β -glucosidische Aktivität des rohen Präparats der β -Galactosidase aus *A. oryzae* konnte in dieser Arbeit bereits zur Partialhydrolyse und die Herstellung einfacher α -Glucoside wie z.B. Allyl-, Pent-4-enyl- und Benzylglucoside in guter Ausbeute und sogar in Grammaßstäben genutzt werden. Gleichmaßen sollte eine Mischung des α,β -Ethylglucosids mit diesem preisgünstigen Proteinpräparat differenzierbar sein.

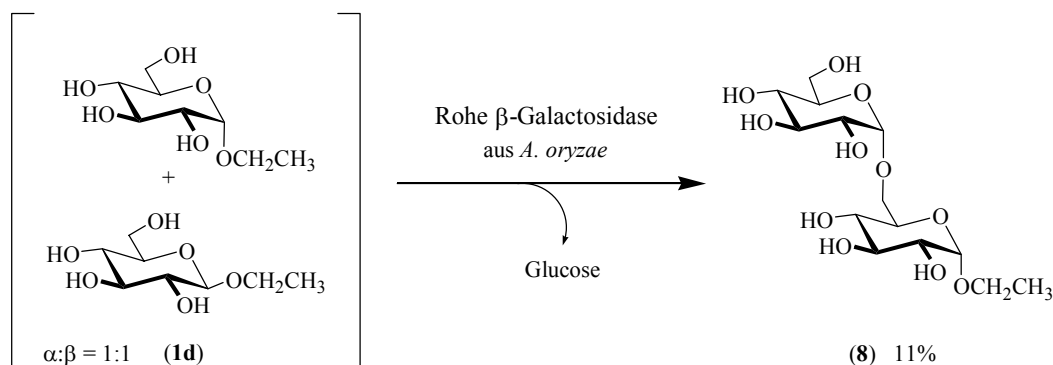
3.1.1. Acetalisierung von D-Glucose mit Ethanol

Bei der Glycosidierung nach *Fischer* wurde Glucose mit Ethanol in Gegenwart eines Kationentauschers bei 80°C über 16h gerührt. Die Suspension wurde abfiltriert, Ethanol im Vakuum entfernt und das Anomerverhältnis durch ^1H -NMR-Spektroskopie ermittelt. Unter

diesen Bedingungen wurde das Pyranosid **1d** im $\alpha:\beta$ Verhältnis von 2:1 und mit 99% Ausbeute gebildet (S. 40, **Tab. 5**). Bei kürzeren Reaktionszeiten (z.B. über 2h) werden neben den Pyranosiden auch Furanoside im Gemisch erhalten. Zwar können die Furanoside durch Extraktion mit Essigester selektiv entfernt werden, jedoch beträgt die Ausbeute an Pyranosiden nur 66% und der Anomerenanteil des α -Isomers ist geringer ($\alpha:\beta = 1:1$).

3.1.2. Partielle Hydrolyse von α,β -Ethyl-D-glucosiden

Zunächst wurde das α,β -Anomergemisch (1:1) des Ethylglucosids (240 mM) mit nominell 560 U/mmol β -Galactosidase aus *A. oryzae* in wässriger Phosphat-Lösung (pH 4.5) bei RT inkubiert. Mittels DC wurde die Bildung freier Glucose sowie eines Nebenproduktes verfolgt. Nach 24h wurde das Reaktionsgemisch durch Chromatographie an Kieselgur/Aktivkohle aufgetrennt. Hauptprodukt und Nebenprodukt wurden spektroskopisch durch NMR analysiert. Das Nebenprodukt konnte erst nach Peracetylierung zweifelsfrei als das Disaccharid **8** identifiziert werden. Offenbar war es durch Transglycosylierung in absoluter Ausbeute von 11% gebildet worden. Der Umsatz war allerdings unvollständig, so daß das Edukt als $\alpha:\beta$ Anomergemisch von ca. 1:1 zu 56% wieder zurückerhalten wurde.



Das rohe Proteinpräparat der β -Galactosidase aus *A. oryzae* enthält vermutlich sowohl α - als auch β -Hexosidase, wodurch die Bildung des Disaccharids **8** erklärt werden kann. *Thiem et al.* beschrieben bereits die Transglycosylierung von 4-Nitrophenyl- β -glucosid mit einem Rohpräparat an β -Galactosidase aus *A. oryzae* in einer gepufferten Lösung (pH 5) mit 50% Acetonitril, wodurch ein α verknüpftes Disaccharid erhalten wurde.^[170] Obwohl dieses Resultat nicht näher erklärt werden konnte, könnte es sein, daß das Enzympräparat eine invertierende β -Hexosidase enthält.

Diese invertierende β -Glycosidase muß die Transglycosylierung und Hydrolyse des β -Glucosids bewirken. In weiteren Versuchen waren längere Reaktionszeiten und weniger konzentrierte Lösung erforderlich. So wurden zunächst verschiedene gepufferte Lösungen (pH 4.5) von α,β -Ethyl-D-glucosid (10 mM) mit verschiedenen Mengen des Enzyms (von 460 bis 1162 U/mmol Substrat) bei 37°C umgesetzt. Nach 3d war das intermediär auftretende Nebenprodukt **8** wieder vollständig hydrolysiert. Die Proben wurden spektroskopisch durch ¹H-NMR analysiert, die Hydrolyse des β -Anomers war jedoch noch immer nicht vollständig erfolgt.

Um zu prüfen, ob freies Ethanol eine hemmende Wirkung auf das aktive Enzym hat, wurde folgender Versuch mit dem bereits vom Enzym erfolgreich hydrolysierten α,β -Benzylglucosid durchgeführt. Mit einem Phosphat-Puffer (pH 4.5) wurden zwei Lösungen des α,β -Benzylglucosids hergestellt und 1 bzw. 5% Ethanol zugegeben. Die entsprechenden Lösungen wurden mit 560 U β -Galactosidase/mmol Substrat bei 37°C inkubiert. Nach 2d war die partielle Hydrolyse der Reaktionslösungen erfolgreich abgeschlossen (¹H-NMR-Analyse). Eine hemmende Wirkung von Ethanol auf das Enzym war somit nicht nachzuweisen.

Crout und Mitarbeiter hatten Aktivitäten von β -Hexosidasen in roher α -Amylase aus *A. oryzae* beschrieben.^[166] Bereits bei der Suche nach optimalen Bedingungen mit diesem Präparat stellte sich allerdings heraus, daß das kommerzielle Präparat die vollständige Hydrolyse beider Isomere bei RT und einem pH-Wert von 4.5 bewirkt und damit für den gesuchten Zweck unbrauchbar ist.

Zur weiteren Optimierung der partiellen Hydrolyse des α,β -Ethylglucosids wurde als nächstes die Enzymqualität modifiziert. Mit der β -Glucosidase aus Mandeln wurde ein Anomerengemisch ($\alpha:\beta = 2:1$) des Ethylglucosids (**1d**) mit 4U Enzym/mmol Substrat in einer gepufferter Phosphat-Lösung (pH 5.5) bei 37°C inkubiert. Die Umsetzung wurde durch ^1H -NMR-Spektroskopie verfolgt. Nach 10d wurde die wässrige Lösung im Vakuum eingeeengt und durch Umkristallisation aus Methanol die freie Glucose sowie die Puffersalze entfernt. Der Rückstand wurde durch Umkristallisation aus Ethanol, dann aus Acetonitril gereinigt. Die absolute Ausbeute lag bei 64% des α -Ethylglucosids (α -**1d**).

Offenbar ist die β -Glucosidase aus Mandeln für den vorliegenden Zweck weit besser geeignet, weil kein Nebenprodukt durch Transglycosylierung erhalten wurde. Das gewünschte α -Glucosid konnte einfach durch Umkristallisation gereinigt werden.

Tabelle 6 Hydrolyse von α : β -Glycosiden mit α -Glucosidase aus Hefe (*Sorte A*), β -Glucosidase aus Mandeln (*Sorte B*), β -Galactosidase (roh) aus *A. oryzae* (*Sorte C*).

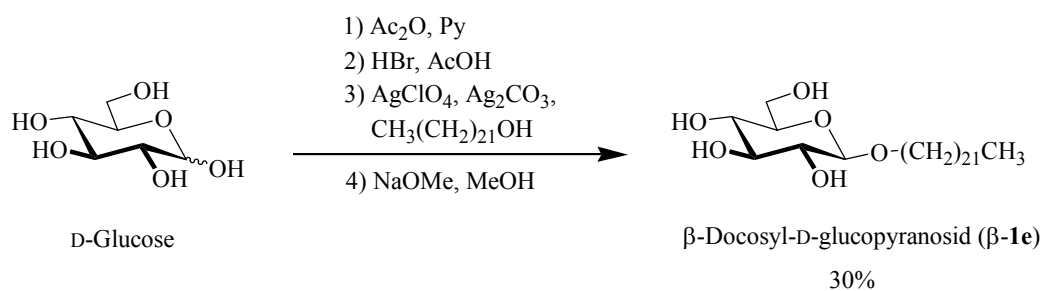
Eintrag	Substrat	anomeres Verhältnis	Maßstab (mmol)	Glycosidase		absolute Ausbeute (%)	relative Ausbeute ^a (%)
				Sorte	(U/mmol)		
1	Allyl-D-glucosyl-1a	4.5:2.5	0.9	A	250	35	100
2	Pent-4-enyl-D-glucosyl-1b	2:1	0.8	A	250	30	100
3	Benzyl-D-glucosyl-1c	4:3	0.7	A	370	42	99
4	Allyl-D-glucosyl-1a	4.5:2.5	31.8	B	6.0	64	100
5	Pent-4-enyl-D-glucosyl-1b	2:1	6.8	B	6.0	66	100
6	Benzyl-D-glucosyl-1c	4:3	29.6	B	6.0	55	97
7	Ethyl-D-glucosyl-1d	2:1	960.5	B	4	64	96
8	Allyl-D-glucosyl-1a	4.5:2.5	31.8	C	560 ^b	64	100
9	Pent-4-enyl-D-glucosyl-1b	2:1	4.8	C	560 ^b	66	100
10	Benzyl-D-glucosyl-1c	4:3	7.8	C	560 ^b	53	92
11	Allyl-D-galactosyl-2a	2:1	31.8	C	72	66	100
12	Pent-4-enyl-D-galactosyl-2b	2:1	10.5	C	72	66	100
13	Benzyl-D-galactosyl-2c	4.9:2.1	19.3	C	72	69	100
14	Allyl-D-xylo-3a	2:1	36.8	C	560 ^b	65	100
15	Pent-4-enyl-D-xylo-3b	2:1	5.7	C	560 ^b	65	98
16	Benzyl-D-xylo-3c	4.3:2.7	31.8	C	560 ^b	61	100
17	Allyl-L-arabino-4a	1.5:3.2	5.8	C	605 ^b	46	100
18	Pent-4-enyl-L-arabino-4b	1.8:3.1	6.2	C	605 ^b	45	100
19	Benzyl-L-arabino-4c	1.8:3.1	3.1	C	605 ^b	45	100
20	Allyl-2-acetamido- 2-desoxy-D-glucosyl-5a	4.3:2.7	38.3	C	560 ^b	60	98
21	Pent-4-enyl-2-acetamido- 2-desoxy-D-glucosyl-5b	6:1	4.1	C	560 ^b	76	91
22	Benzyl-2-acetamido- 2-desoxy-D-glucosyl-5c	2:1	24.5	C	560 ^b	64	98

^a Die relative Ausbeute beruht auf der anwesenden Anomerfraktion im Ausgangsgemisch.

^b Die Menge entspricht der nominalen β -Galactosidase-Aktivität.

4.1 Synthese von β -Docosyl-D-glucopyranosid

Ganglioside sind Glycolipide, bei denen der hydrophile Zuckeranteil an ein hydrophobes Ceramid gebunden ist. Der Ceramid-Rest wiederum setzt sich aus dem Aminoalkohol Sphingosin und einer Fettsäure zusammen.^[171] Bei der Synthese verschiedener Gangliosidanalogue mit vermutlichen physiologischen Aktivitäten wurde in einer langen Reaktionssequenz das Intermediat β -Docosyl-D-glucopyranosid (β -1e) nach der *Koenigs-Knorr-Reaktion* in 30% Ausbeute erhalten.^[172]



Mit der spezifischen Hydrolyse durch α -Glucosidase aus Hefe wurden bereits verschiedene einfache β -Glucoside erhalten. Es war interessant zu prüfen, ob diese α -Glucosidase auch ein α/β -Anomerengemisch von Docosyl-D-glucosid durch teilweise Hydrolyse differenzieren kann, wobei das β -Docosyl-D-glucopyranosid (β -1e) erhalten werden sollte.

4.1.1. Acetalisierung von D-Glucose mit 1-Docosanol

Für die Acetalisierung von D-Glucose und 1-Docosanol war eine Mischung von DMF/CH₂Cl₂ (v:v 1/1) erforderlich. Die Reaktion verlief vollständig mit 6 Äquivalenten an Alkohol und BF₃-Etherat als saurem Katalysator bei 65°C innerhalb von 24h. Der Katalysator und das Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt. Nach chromatographischer Trennung an Kieselgel (CH₃Cl/MeOH, 10:1) wurde das Produkt **1e** in pyranoider Form als α : β -Anomerengemisch (1:2) in 87% Ausbeute gewonnen (S. 37, **Tab. 5**).

4.1.2. Enzymatische partielle Hydrolyse von α , β -Docosyl-D-glucosiden

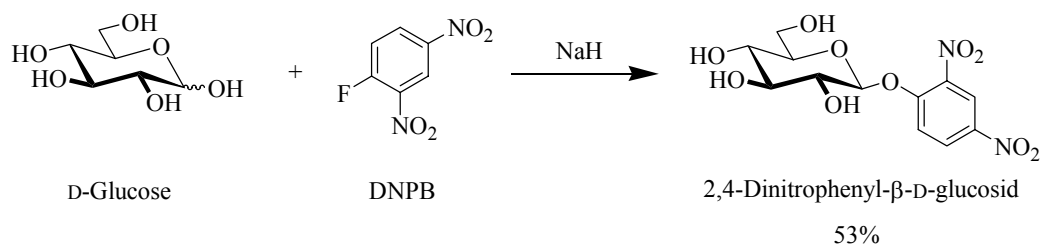
Für den Versuch der partiellen Hydrolyse des α , β -Docosylglucosids mit α -Glucosidase konnte jedoch das Anomerengemisch im Phosphat-Puffer (pH 6.8) bei 37°C nicht gelöst werden. Das Substrat **1e** war sogar weder in wässrigem Puffer mit 40% Cosolvens wie z.B. DMF, Acetonitril, Aceton und DMSO, noch unter Zusatz von Cyclodextrinen löslich. Damit war die Anwendung des Verfahrens aus Löslichkeitsgründen in diesem Fall leider nicht möglich.

5.1 Synthese von einfachen Nitrophenylglycosiden

Nitrophenylglycoside werden oft als Donor bei der Synthese von Oligosacchariden bzw. Glycokonjugaten mit Glycosidasen Transglycosylierung verwendet. Da 2,4-Dinitrophenylglucoside bei der enzymatischen Reaktion mit verschiedenen Glucosidasen eine höhere Reaktivität als konventionelle 2- oder 4-Nitrophenylglycoside aufwiesen,^[173-174] ist die Synthese der 2,4-Dinitrophenylglycoside aus weiteren Monosacchariden wie z.B. Galactose, Pentosen oder *N*-Acetyl-D-glucosamin von großem Interesse.

Aus geschützten Monosacchariden können einfache 2- und 4-Nitrophenylglycoside in drei Reaktionsschritten durch Transglycosylierung mit Tetrabutylammoniumbromid in wässrigem Milieu synthetisiert werden.^[66-67]

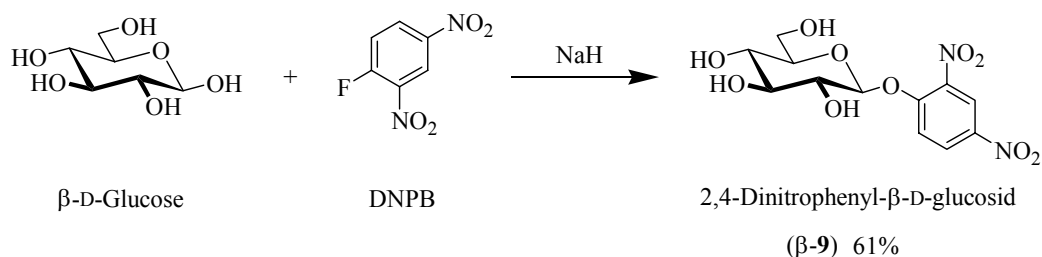
Schmidt et al. beschrieben die Synthese von 2,4-Dinitrophenyl- β -D-glucosid aus freier Glucose in DMF/15-Krone-5-Ether unter basischen Bedingungen, wobei die anomere OH-Gruppe der Glucose mit NaH selektiv deprotoniert und das entstandene Acetalanion mit einem reaktiven Elektrophil wie z.B. 2,4-Dinitrofluorbenzen (DNFB) substituiert wurde. So wurde 2,4-Dinitrophenyl- β -D-glucosid in 53% gewonnen. Allerdings konnte diese Reaktion bisher mit keinem weiteren freien Monosaccharid durchgeführt werden.^[102]



5.1.1. Arylierung von β -D-Glucose

Als erster Versuch wurde die Reaktion mit D-Glucose durchgeführt, wie bereits von *Schmidt et al.* beschrieben. Nach *Schmidt* wurde hierbei freie Glucose mit DNFB und 1.1 Äquivalenten NaH in DMF und 1.1 Äquivalenten 15-Krone-5-Ether umgesetzt. Der Ansatz wurde 2.5h bei RT gerührt und anschließend mit Ionentauscher (H^+ -Form) neutralisiert. Nach Aufreinigung an Kieselgel (Toluol/MeOH, 12/1) wurde hier jedoch ein Gemisch von verschiedenen Isomeren erhalten. Das 2,4-Dinitrophenyl-D-glucosid lag neben weiteren Glucosiden als α : β -Anomerengemisch im Verhältnis von 1:1 vor.

Der Einsatz anomenenreiner β -D-Glucose könnte wegen des aprotischen Milieus (DMF/15-Krone-5-Ether) von Vorteil sein, da hier keine Mutarotation der Glucose zu erwarten ist. β -D-Glucose wurde daher unter den genannten Bedingungen mit DNFB umgesetzt; nach chromatographischer Reinigung erhielt man tatsächlich das 2,4-Dinitrophenyl- β -D-glucosid (β -9) in 61% Ausbeute. Offensichtlich war den Originalautoren der Umstand der anomeren Konfiguration ihres Edukts entweder nicht bekannt gewesen oder die Bedeutung nicht bewußt geworden.



Die Reaktion wurde auch mit dem preiswerteren Dimethylglycol (DME) als Cosolvens versucht. Freie β -D-Glucose wurde dazu mit DNFB und NaH (1.1 Äquivalente) in DMF und 1.1 Äquivalenten DME bei RT umgesetzt, nach 4h wurde mit Kationentauscher neutralisiert. Die Lösung wurde im Vakuum eingengt und wie üblich aufgereinigt. Hierbei wurde das entsprechende Glucosid β -9 in 52% Ausbeute erhalten.

Obwohl die Ausbeute (52%) des letzteren Versuchs leicht geringer gewesen ist, im Vergleich zur Ausbeute (61%) der Arylierung bei Verwendung von 15-Krone-5-Ether, ist jedoch das Verfahren unter Verwendung von DME preisgünstigster.

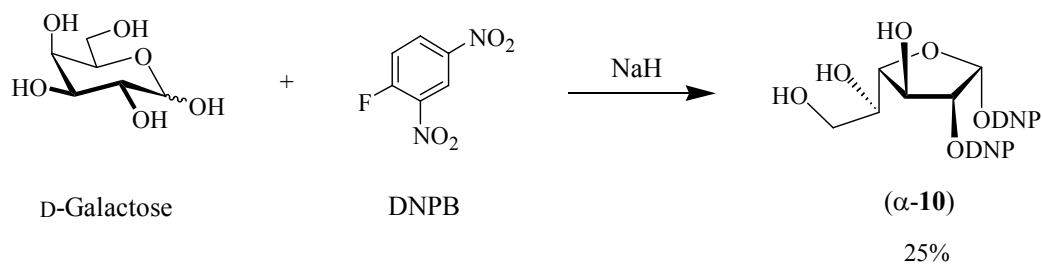
5.1.2. Arylierung von α -D-Glucose

Nach derselben Verfahrensweise wurde freie α -D-Glucose mit DNFB und 1.1 Äquivalenten NaH bei RT in DMF/15-Krone-5-Ether (oder DMF/DME) innerhalb von 3h umgesetzt, um das korrespondierende α -Glucosid selektiv zu erhalten. Trotz mehrfach abgewandelter Versuche waren jedoch nur unbefriedigende Ergebnisse zu erhalten. Die Deprotonierung der α -anomeren Hydroxy-Gruppe ist hierbei im Gegensatz zu dem entsprechenden β -Anomer offenbar nicht regioselektiv (und das O-Anion möglicherweise durch den anomeren Effekt weniger reaktiv), so daß ein schwer trennbares Produktgemisch erhalten wurde.

5.1.3. Arylierung von D-Galactose

In einem weiteren Versuch wurde D-Galactose mit DNFB und 1.1 Äquivalenten NaH in DMF/DME bei RT umgesetzt. Die Umsetzung wurde durch DC verfolgt und nach 20h gestoppt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert. Unter diesen Bedingungen wurde jedoch nicht das entsprechende β -Aryl-galactosid, sondern unerwarteterweise das zweifach substituierte 1,2-Diaryl- α -galactosid (furanoid Form) in immerhin 25% Ausbeute.

Weitere Variationen zur Erzeugung der gesuchten Pyranoside wurden nicht unternommen.



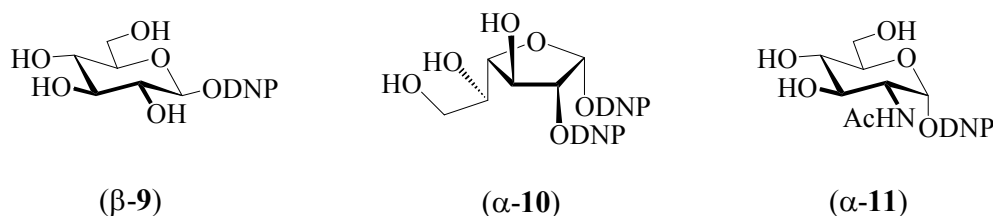
5.1.4. Arylierung von Pentose

Die Umsetzung von D-Xylose (6.6 mmol) wurde ebenfalls mit NaH (6.6 mmol) und DNFB in DMF und 6.6 mmol 1,3-Dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2-(1H)-pyrimidinon (DMPU) als Cosolvens bei RT über 4h durchgeführt. Trotz der chromatographischen Trennung wurde nur ein nicht näher definierbares Isomerengemisch in einer Ausbeute von 24% erhalten.

Optimierungsversuche erschienen wenig zweckdienlich.

5.1.5. Arylierung von *N*-Acetyl-D-glucosaminosid

Die Arylierung von *N*-Acetyl-D-glucosamin wurde ebenfalls mit DNFB und 1 Äquivalent NaH in DMF/DMPU bei RT innerhalb von 3h versucht. Nach üblicher Aufarbeitung wurde das 2,4-DNP-2-acetamido- α -glucopyranosid (α -11) in 7% Ausbeute erhalten. Aus Gründen der einfachen präparativen Durchführung wäre dies trotz niedriger Ausbeute eventuell eine kostenmäßig akzeptable Alternative zur konventionellen Mehrstufensynthese nach *Koenigs-Knorr*.



DNP = 2,4-Dinitrophenyl

Abb. III.5 Synthetisierte Arylglycoside durch basische Glycosidierung.

6. Synthese des Disaccharids β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Xyl

6.1. Einleitung

Innere Disaccharidasen (Glycosidasen) bei Säugern findet man in der Schleimhaut des Darms, wo die enzymatische Hydrolyse von Disacchariden durchgeführt wird. Ein Mangel dieser Glycosidasen ist häufig die Ursache von Magen-Darm-Problemen. Weltweit haben durchschnittlich ca. 50-90% der Erwachsenen einen Lactosidase-Mangel (Disaccharidase), der oftmals schon im Alter von 3-5 Jahren ausgebildet wird. Eine quantitative Schätzung von Lactosidase ist daher für Kinder- sowie Magen-Darm-Ärzte von besonderem Interesse.^[115-118]

Das Disaccharid 4-*O*- β -D-Galactopyranosyl-3-*O*-methyl-D-glucose (3-*O*-Methyl-Lactose) ist ein weiteres Substrat für die Lactosidase. Nach oraler Verabreichung wird diese Verbindung in Galactose und 3-*O*-Methyl-D-glucose hydrolysiert. Die freie 3-*O*-Methyl-D-glucose wird jedoch im Darm absorbiert und daher nur langsam ausgeschieden. Durch HPLC kann diese Verbindung in Urin bestimmt werden.^[175-177]

Wegen der zeitaufwendigen Bestimmung des Lactosidase-Spiegels mit Hilfe von 3-*O*-Methylactose werden zur Zeit weitere Disaccharide als mögliche Substrate der Lactosidase untersucht.

Das Disaccharid 4-*O*- β -D-Galactopyranosyl-D-xylopyranosid (β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Xyl) ist ebenfalls ein Substrat für die Lactosidase.^[178] Die Verbindung β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Xyl wird oral verabreicht, wobei nach Hydrolyse die freie D-Xylose im Darm absorbiert und nicht phosphoryliert wird.^[179] Die ausgeschiedene Xylose kann nun leicht im Urin durch kolorimetrische Verfahren quantitativ bestimmt werden.

Das Disaccharid β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Xyl ist auch bekannt als Verbindungsglied zwischen dem Core-Protein und dem Polysaccharidteil (Glycosaminoglycan) in Proteoglycanen.^[180-182]

Die chemische Synthese von β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Xyl wurde durch *Rivera-Sagredo* und Mitarbeiter durchgeführt, wobei das Disaccharid in sieben Reaktionsschritten und einer Gesamtausbeute von 7% erhalten wurde.^[93]

Die Synthese von Disacchariden ohne aufwendige Schutzgruppenmanipulationen von Donor und Akzeptor kann durch Enzyme realisiert werden. Wegen der hoher Produktivität bei geringen Kosten werden die Glycosidasen hierbei gegenüber den Glycosyltransferasen bevorzugt eingesetzt.^[59,63-64,121-122]

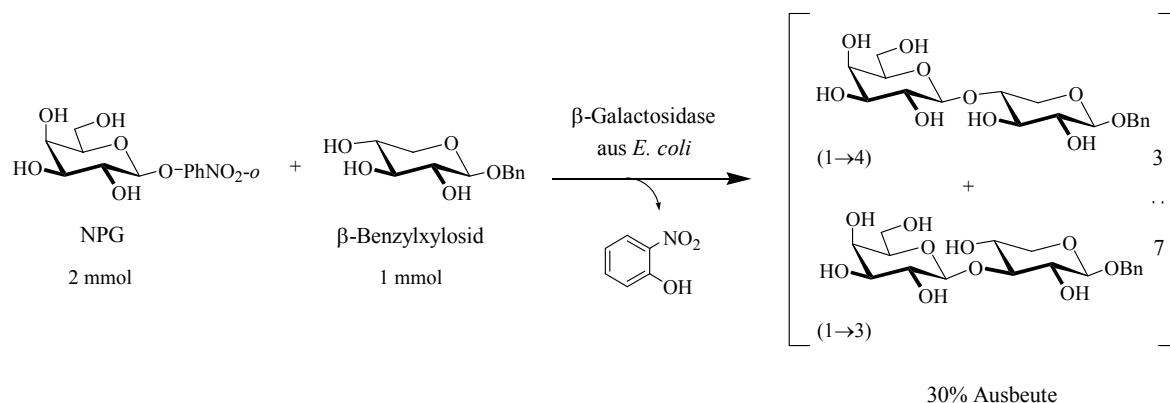
Glycosidasen sind im allgemein streng spezifisch bezüglich des glyconischen Teil des Substrats und dessen anomerer Konfiguration, oft jedoch relativ unspezifisch bezüglich der aglyconischen Komponente. Ein Donor kann mit einem Akzeptor unter kinetischer Kontrolle transglycosyliert werden. Die Glycosidasen sind wenig regioselektiv, deshalb wird oft ein schwer trennbares Isomerengemisch gebildet. Man kann allerdings durch eine konfigurative Veränderung des Akzeptors an dessen anomerem Zentrum die Regioselektivität der Transferreaktion deutlich verbessern.^[140-141] Im Hinblick auf gesuchte (1 \rightarrow 4)-Verknüpfung zur Synthese des Disaccharids β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Xyl durch Transglycosylierung mit β -Galactosidase aus *E. coli* waren verschiedene Donoren und Akzeptoren mit β -Konfiguration getestet worden. Die Ausbeuten lagen dabei zwischen 6 und 36%. Die Regioselektivitäten für die (1 \rightarrow 4)-Verbindung sind jedoch von 30 bis 90% deutlich unterschiedlich.^[142-145]

Durch partielle Hydrolyse von Anomerengemischen mit der rohen β -Galactosidase aus *A. oryzae* standen Allyl-, Pent-4-enyl- und Benzyl- α -D-xyloside in größeren Mengen bereit. Diese konnten daher als Xylosylakzeptor bei der Synthese des Disaccharids β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Xyl eingesetzt werden. Die aglyconische Benzylgruppe ist im Vergleich zu der Allyl- bzw. Pent-4-enylgruppen sterisch anspruchsvoller und könnte daher die Regioselektivität der (1 \rightarrow 4)-Verknüpfung verbessern. Auf der anderen Seite kann man als Glycosyldonor z.B. das β -Nitrophenylgalactosid oder die preiswerte Lactose einsetzen.

6.2. Transglycosylierung

Huber et al. fanden bei pH 7.0-7.8 hohe transglycosylierende Aktivität mit β -Galactosidase aus *E. coli* für den Galactosyl-Rest der Lactose. Ebenfalls wurde die Beobachtung gemacht, daß die Aktivität des Enzyms um ca. 30% verringert wird, wenn ein Puffer ohne Mg^{2+} benutzt wurde.^[183]

Fernández-Mayoralas et al. beschrieben mit der β -Galactosidase aus *E. coli* die Transferreaktion (260 U/mmol) von 2-Nitrophenyl- β -D-galactosid (100 mM) und β -Benzyl-D-xylosid bei RT und pH 7 in einem Phosphat-Puffer (1 mmol $MgCl_2$). Die Reaktion wurde durch HPLC-Kontrolle über 3h durchgeführt, wobei die Disaccharide (1 \rightarrow 4/3) in Verhältnis von ca. 3 zu 7 und mit einer Ausbeute von 30% gebildet wurden.^[142] Diese Bedingungen sollten auch auf die Transglycosylierung des Galactosyl-Donors auf das α -Benzylxylosid anwendbar sein.



Hierzu wurden 2-Nitrophenyl- β -D-galactosid (NPG) und α -Benzyl-D-xylosid (α -**3c**) in Phosphat-Magnesium-Puffer (pH 7) mit β -Galactosidase aus *E. coli* inkubiert. Nach 3.5h wurde die Lösung kurze Zeit auf 80°C erhitzt, um die hydrolytische Funktion des Enzyms zu zerstören. Das freie 2-Nitrophenol wird mit Ether extrahiert und die wässrige Lösung im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde durch Chromatographie an Kieselgel (Toluol/MeOH, 240/4 bis 240/40) gereinigt. Das Edukt α -**3c** wurde in 30% wiedergewonnen, aber das Produkt gemeinsam mit freier Galactose eluiert. Das Produkt-Galactose-Gemisch wurde daher in einem zweiten Schritt über eine RP-Säule abgetrennt. Galactose wurde leicht mit Wasser eluiert, während das Disaccharid durch Eluierung mit Ethanol in 21% Ausbeute erhalten wurde. Das Disaccharid **12** war in freier Form jedoch durch NMR-Spektroskopie nicht sicher zu identifizieren, daher wurde mit Acetanhydrid/Pyridin bei RT peracetyliert. Das geschützte Disaccharid wurde durch Umkristallisation aus Diethylether/Petrolether in 95% Ausbeute erhalten und war nun zweifelsfrei durch NMR charakterisierbar.

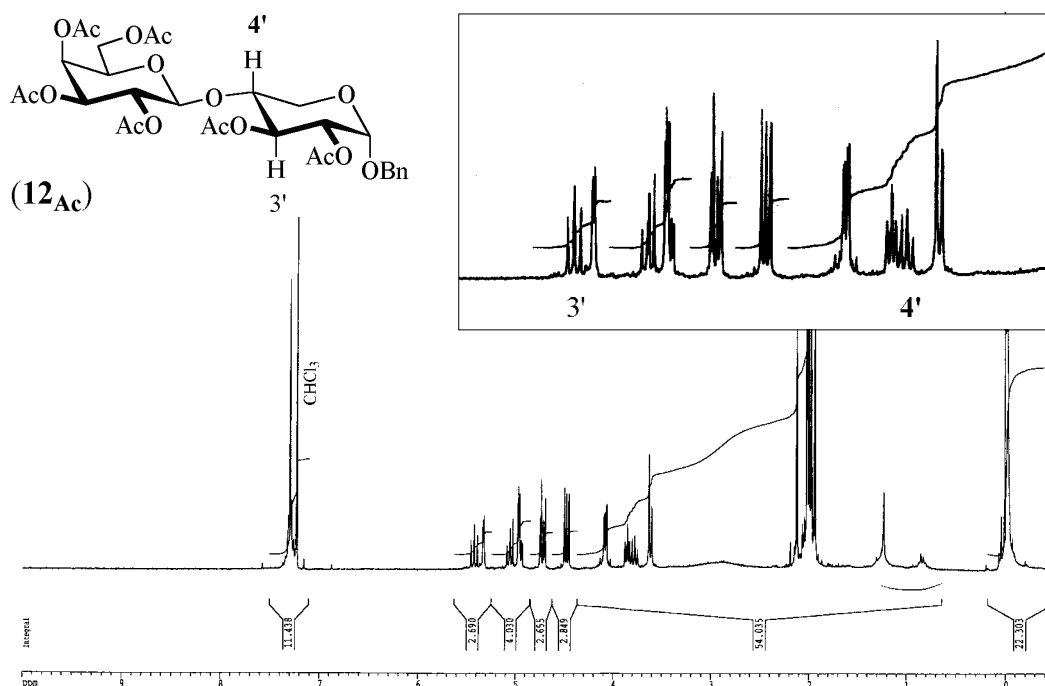
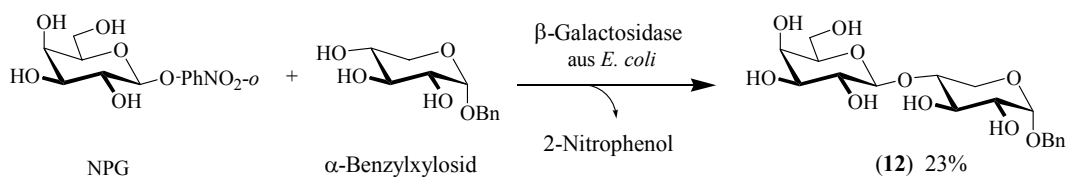


Abb. III.6 ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz; CDCl_3) des peracetylierten Disaccharids (**12_{Ac}**).

Im ^1H -NMR-Spektrum der peracetylierten Verbindung **12_{Ac}** wurden die Protonen **3'** und **4'** auf 5.42 bzw. 3.78 ppm verschoben (**Abb. III.6**). Die Hochfeldverschiebung von **4'**-H beruht auf der Acetal-Bindung mit dem Galactosyl-Rest. Das **4'**-H zeigte zwei Kopplungskonstanten mit **3'**-H ($J = 9.4$ Hz) und **5'**-H_{ab} ($J = 7.6$ Hz). Das Proton **3'** zeigt eine Kopplungskonstante mit **2'**-H von $J = 10.2$ Hz. Diese Schlußfolgerung wurde ebenfalls durch COSY-Messung bestätigt.

Unter denselben Bedingungen wurde auch eine gepufferte Lösung des Xylosids α -**3c** mit NPG und β -Galactosidase inkubiert. Durch DC-Kontrolle (MeOH/Toluol, 2:1) wurde die Bildung des gewünschten Produkts (R_f 0.5) verfolgt. Nach 4h wurde ein weiteres Äquivalent NPG zugegeben und noch 1h gerührt. Das Enzym wurde durch Erhitzen auf 80°C denaturiert und nicht umgesetztes Edukt α -**3c** konnte durch Extraktion mit Essigester teilweise entfernt werden. Das Disaccharid **12** wurde durch Chromatographie an RP-Material abgetrennt. Durch

Elution mit Wasser wurden zunächst freie Monosaccharide und Nebenprodukte entfernt. Mit Wasser/Ethanol (93/7 bzw. 90/10) wurden das Produkt, dann das restliche Edukt eluiert. Das β -Gal-(1 \rightarrow 4)- α -Xyl-OBn (**12**) wurde so in 23% Ausbeute erhalten.



Die Transglycosylierung kann ebenfalls mit Lactose durchgeführt werden. Hierbei wurde eine gepufferte Lösung von Lactose (100 mM) und α -Benzyl-D-xylosid mit der β -Galactosidase (260 U/mmol) inkubiert. Nach 3h wurde ein weiteres Äquivalent Lactose zugegeben und weitere 2h gerührt. Das Produkt wurde durch Reinigung über RP-Kieselgel in einer Ausbeute von 15% gewonnen.

6.3. Vergleich der Aktivierung von NPG gegenüber Lactose

Als erster Schritt erfolgt eine kovalente Verknüpfung (ES_1) zwischen dem retinierenden Enzym (E) und dem Substrat (S_1). Dieser Reaktionsschritt ist mit NPG als S_1 rasch und aufgrund der nucleofugen Eigenschaften von freiem 2-Nitrophenol nicht umkehrbar. Die praktisch gegenüber dem α -Benzyl-D-xylosid (S_2) als Akzeptor nicht vorhandene Affinität des 2-Nitrophenols zur Akzeptor-Bindungsstelle verhindert die Resynthese ($k_2 \gg k_{-2}$) und fördert die Synthese des Disaccharids (**Abb. III.7**).

Die Kinetik der Transferreaktion des Galactosyl-Rests folgt dem nachstehenden Ansatz:

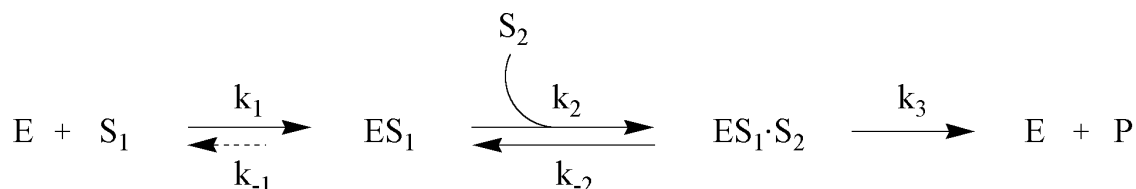


Abb. III.7 Kinetik der Transgalactosylierung. E = Enzym, S_1 = Glycosyldonor, S_2 = Glycosylakzeptor, ES_1 = Glycosyl-Enzym-Intermediat, $\text{ES}_1 \cdot \text{S}_2$ = Glycosylenzym-Glycosylakzeptor, P = Produkt.

Mit dem Enzym (E) und der Lactose (β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Glc) als Substrat (S_1) erfolgt ebenfalls die Bildung von Enzym-Substrat (ES_1). Im Vergleich zu 2-Nitrophenol beteiligt sich die freie Glucose an der Transferreaktion als Akzeptor. Daher findet erstens zum ersten geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritt eine Rückreaktion statt, und zweitens tritt als Nebenreaktion die Synthese von Allolactose (β -Gal-(1 \rightarrow 6)-Glc) auf.^[183] Insgesamt ist deshalb die Geschwindigkeit der 1 \rightarrow 4 Transglycosylierung mit α -Benzyl-D-xylosid (S_2) langsamer ($k_2 > k_{-2}$).

6.4. Recycling der β -Galactosidase

Üblicherweise wird bei der Transglycosylierung die überschüssige Aktivität der β -Galactosidase nach 4h Reaktionszeit durch Erhitzen auf 80°C gehemmt. Bei einer anderen Methode wird das Enzym an eine Festphase fixiert und nach der Reaktion einfach abfiltriert. Das noch aktive Enzym kann nun weiter verwendet werden, aber die Regioselektivität verringert sich bei weiteren Umsetzungen. Außerdem verliert die Glycosidase durch die Fixierung an Aktivität.

Auch durch Ultrafiltration kann die β -Galactosidase vom Reaktionsansatz abgetrennt werden. Als Grundlage dient hierbei eine Membran, die nur für kleine Moleküle durchlässig ist. Auf diese Art kann die β -Galactosidase aus *E. coli* mit ihrem großen Molekulargewicht (135 kDa) zurückgehalten werden, nicht aber die weiteren Komponenten der Umsetzung mit kleineren Molekulargewichten.^[184] Das Enzym kann dann erneut mit frischer Reaktionslösung umgesetzt werden, dieses Verfahren ist bekannt als *Repetitive-Batch*.^[185]

Die Reaktion wurde in der Praxis in einer Ultrafiltrationszelle mit Enzymlösung durch Zugabe von Substrat und Akzeptor durchgeführt. Nach beendeter Reaktion wurde die Reaktionslösung durch eine Ultrafiltrationsmembran mit einer molekularen Ausschlußgröße von 10 kDa (YM 10) filtriert, wobei das makromolekulare Protein in der Zelle zurückbleibt. Durch erneutes Auffüllen der Rührzelle mit frischer Reaktionslösung kann der Reaktionszyklus erneut durchlaufen werden (**Abb. III.8**).

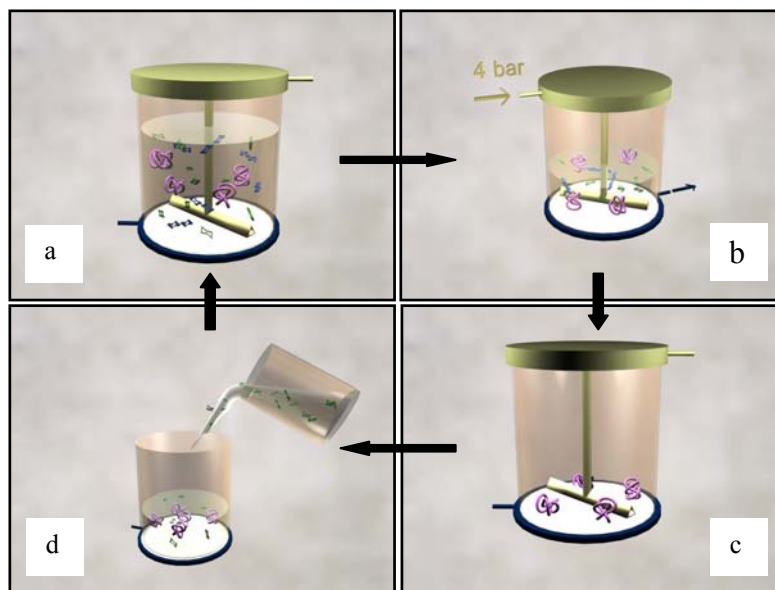


Abb. III.8 Recycling von β -Galactosidase aus *E. coli* mittels Ultrafiltrationsmembran für die Transgalactosylierung des Disaccharids **12** mit Lactose. Hier: **a** = Reaktion, **b** = Filtration, **c** = zurückgehaltenes Enzym, und **d** = Wiederauffüllen.

Das recht unpolare Edukt wurde teilweise mittels Extraktion mit Essigester wiedergewonnen. Der wässrige Puffer wurde durch Chromatographie an RP-Material gereinigt. Das Produkt wurde noch in geringer Ausbeute von 6% erhalten. Das Enzym zeigte noch genug Aktivität, um weitere vier Umsetzungen vorzunehmen, wobei insgesamt eine Ausbeute von 20% zu erreichen war.

Zur der Abspaltung der Benzylschutzgruppe wurde das Disaccharid **12** mit Palladium auf Kohlenstoff (10%) und Wasserstoff (1 bar) in Ethanol/Wasser (v:v 1:1) eingesetzt, wobei die Umsetzung bei RT 48h lang unter diesen Bedingungen nicht zu erreichen war. Die Suspension

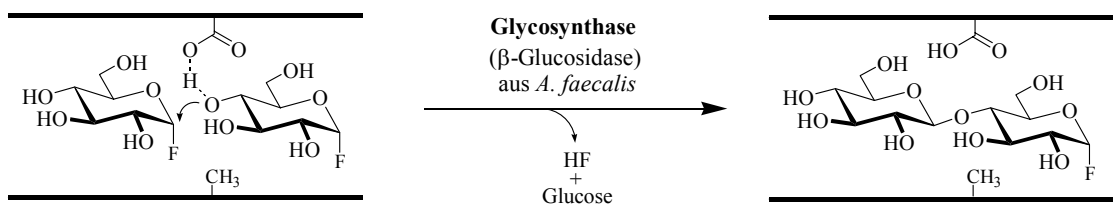
wurde dann bei 50°C unter 60 bar Wasserstoffdruck umgesetzt, trotz langer Reaktionszeit (48h) konnte keine Abspaltung (DC-Kontrolle, EE/Isopropanol/H₂O, 3/2/2) beobachtet werden. Neue Versuche wurden mit weiteren Lösungsmitteln (Methanol, Methanol/Wasser, Ethanol/Methanol usw.) sowie größere Menge des Katalysators durchgeführt, wobei die Umsetzung in Ethanol/Wasser/Essigsäure nach 24h bei 50°C unter 60 bar Wasserstoffdruck erforderlich war. Das freie β -D-Galactosyl-(1 \rightarrow 4)-D-xylosid (**13**) wurde über eine RP-Kieselgelsäule nach Waschen mit Wasser leicht gereinigt und in 80% Ausbeute erhalten, das nicht umgesetzte Edukt wurde nach Elution mit Ethanol wiedergewonnen. Das Disaccharid **13** wurde durch NMR-Analyse bestimmt.^[93]

Anschließend wurde auch die Transglycosylierung mit der preisgünstigeren β -Galactosidase aus *A. oryzae* versucht, wobei eine gepufferte Lösung (pH 4.5) von NPG (100 mM) und Akzeptor α -**3c** mit dem Enzym (130 U/mmol) bei 30°C inkubiert wurde. Anhand des *R_f*-Wertes des Produkts konnte im DC nach 2h bei 90°C Umsatz beobachtet werden. Das Reaktionsgemisch wurde über eine RP-Säule getrennt. Durch NMR-Analyse konnte jedoch das resultierende Isomerengemisch (8% Ausbeute) nicht eindeutig charakterisiert werden. Damit ist das *A. oryzae*-Enzym demjenigen aus *E. coli* für die gesuchte Transglycosylierung klar unterlegen.

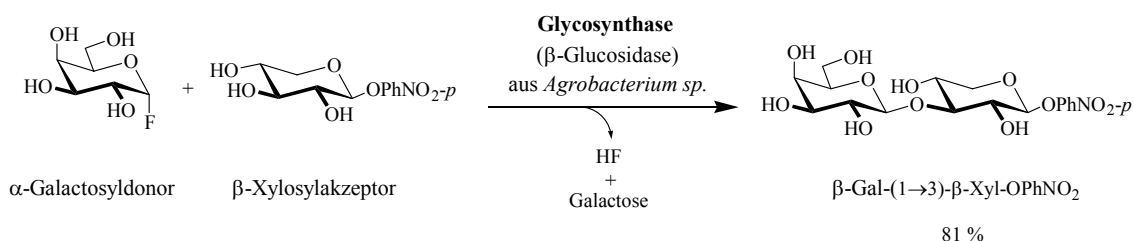
6.5. Ausblick

Mit der β -Galactosidase aus *E. coli* konnte die hoch regioselektive Synthese von β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Xyl erreicht werden. Durch die kinetische Transglycosylierung wird der β -Galactosyl-Rest mit dem α -Benzyl-D-xylosid verknüpft. Das Disaccharid β -Gal-(1 \rightarrow 4)- α -Xyl-OBn wird auf diese Weise regioselektiv gebildet. Thermodynamisch wird jedoch das erzeugte Produkt von demselben Enzym auch wieder hydrolysiert, daher ist die Herstellung des Produkts nur mit begrenzter Ausbeute möglich.

Die Synthese von Oligosacchariden, ohne daß das gebildete Produkt durch die natürliche Funktion der Glycosidase thermodynamisch hydrolysiert wird, kann neuerdings mit modifizierten Glycosidasen durch *Protein engineering* erzielt werden.^[186-190] *Withers et al.* beschrieben das genetische Modulieren und Modellieren der retinierenden β -Glucosidase aus *Agrobacterium faecalis*. Die resultierende *Glycosynthase* kann das 2,4-Dinitrophenyl- β -D-glucosid nicht hydrolysieren. Durch die genetische Modifikation des Enzyms wurde die Aminosäure Glu358 verändert, deren nukleophile Carboxyl-Gruppe bei der Hydrolyse ein kovalentes Intermediat mit dem anomeren Zentrum des β -D-Glucosids gebildet hatte. Allerdings kann die Glycosynthase einen Glycosyldonor mit der entgegengesetzten Konfiguration wie zum Beispiel α -Glucosylfluorid transglycosylieren. Also ist das β -konfigurierte Produkt kein Substrat für die Glycosynthase.^[191-194]



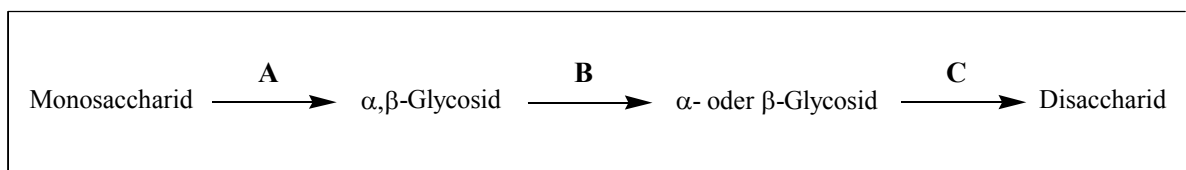
Der Glucosyl- sowie Galactosyl-Transfer wurde mit dieser Glycosynthase und verschiedenen Akzeptoren von β -Konfiguration durchgeführt, wobei Oligosaccharide (1 \rightarrow 4)-regioselektiv gebildet wurden. Die Ausbeute lagen zwischen 64 und 92%. Das Enzym zeigte keine Affinität zu der axialen Hydroxyl-Gruppe an C-4, daher forderte der konkurrierende Galactosyl-Transfer mit demselben Donor nicht. Eine Ausnahme war die regioselective (1 \rightarrow 3)-Verknüpfung von β -Xylosylakzeptor mit Glucosyl- sowie Galactosyl-Donor.^[193]



Ebenso wurden bereits Endoglucanasen mutiert. Die Gruppe von *Planas* hat zwei Glycosynthasen durch die genetische Modifizierung von retinierender 1,3-1,4- β -Glucanase aus *Bacillus licheniformis* erhalten.^[195] *Driguez* und Mitarbeiter beschrieben die Mutation von retinierender Endoglucanase I (Cel7B) aus *Humicola insolens*.^[196] Die Transferreaktion wurde mit den Donoren α -Laminaribiosylfluorid (β -Glc-(1 \rightarrow 3)- α -Glc-F) bzw. α -Lactosylfluorid (β -Gal-(1 \rightarrow 4)- α -Glc-F) und verschiedenen einfachen Glycosiden sowie Disacchariden als Akzeptoren mit den entsprechenden Glycosynthasen durchgeführt, wobei Tri- und Tetrasacchariden in Ausbeuten von 51 bis 100% (1 \rightarrow 4)-regioselektiv verknüpft hergestellt werden.

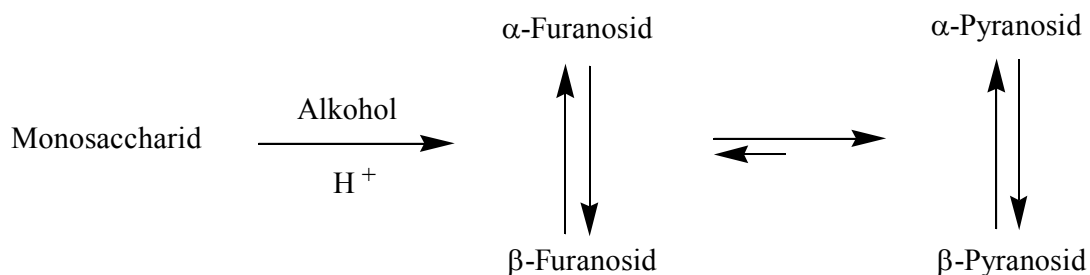
IV. Zusammenfassung

Aus freien Monosacchariden konnte durch Acetalisierung mit verschiedenen Alkoholen die entsprechenden α,β -Glycoside aufgebaut werden. Für die Differenzierung der erhaltenen Anomerengemische wurden die spezifische hydrolytische Funktion der Glycosidasen genutzt, um so anomerenreine α - oder β -Glycoside zu erhalten. Auf diese Weise wurde ein Zugang für die stereoselektive Synthese von Disacchariden durch Transglycosylierung mit Glycosidasen geöffnet. Exemplarisch konnte das erzeugte α -Benzylxylosid als Akzeptor für den hoch regioselektiven Aufbau des Disaccharids 4-*O*- β -D-Galactopyranosyl-D-xylopyranosid genutzt werden.

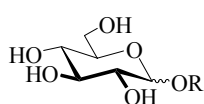


A) Ausgehend von den Monosacchariden D-Glucose, D-Galactose, D-Xylose, L-Arabinose, D-Arabinose, *N*-Acetyl-D-glucosamin und L-Fucose konnten Anomerengemische der entsprechenden α,β -Glycoside durch Acetalisierung mit verschiedenen Alkoholen

(Allylkohol, Benzylalkohol, 4-Pentenol, Ethanol und 1-Docosanol) nach der *Fischer-Reaktion* erhalten werden.

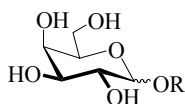


Unerwünschte Furanoside konnten hierbei leicht durch Extraktion mit organischen Solventien wie Ether oder Essigester entfernt werden, wodurch die gewünschten Pyranoside in Ausbeuten von 63 bis 99% gewonnen werden konnten.



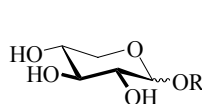
α,β -D-Glucoside
(1a-e)

63-99%



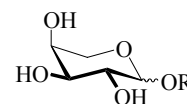
α,β -D-Galactoside
(2a-c)

71-99%



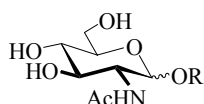
α,β -D-Xyloside
(3a-c)

81-99%



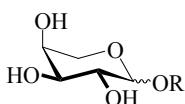
α,β -L-Arabinoside
(4a-c)

69-71%



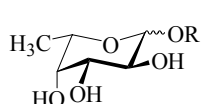
N-Ac- α,β -D-Glucosaminoside
(5a-c)

92-99%



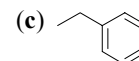
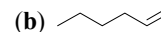
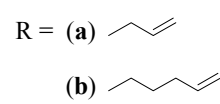
α,β -D-Arabinosid
(6a)

70%

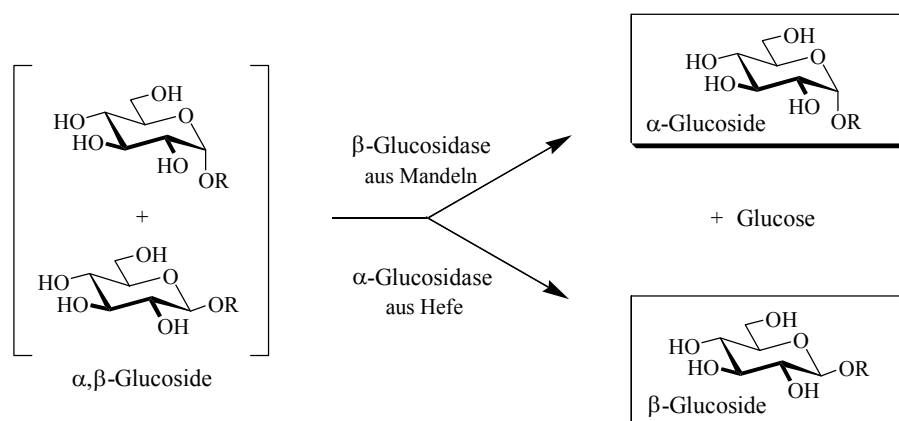


α,β -L-Fucosid
(7a)

80%



B) Die Anomerengemische der Glucoside (**1a-d**) konnten mit β -Glucosidase aus Mandeln bei RT durch partielle Hydrolyse differenziert werden, wobei einfache α -Glucoside (α -**1a-d**) in absoluten Ausbeuten von 55 bis 66% erhalten werden konnten. Ebenfalls wurden die Anomerengemische (**1a-c**) mit α -Glucosidase aus Hefe partiell hydrolysiert, hierbei wurden reine β -Glucoside (β -**1a-c**) in Ausbeuten von 30 bis 42% erzielt.



Anomere Mischungen von Allyl-, Pent-4-enyl- und Benzyl- α,β -D-galactosiden wurden ebenfalls mit β -Galactosidase aus *A. oryzae* bei RT teilweise hydrolysiert, hierbei wurden erfolgreich einfache α -Galactoside (α -**2a-c**) in guten Ausbeuten (66-69%) gewonnen.

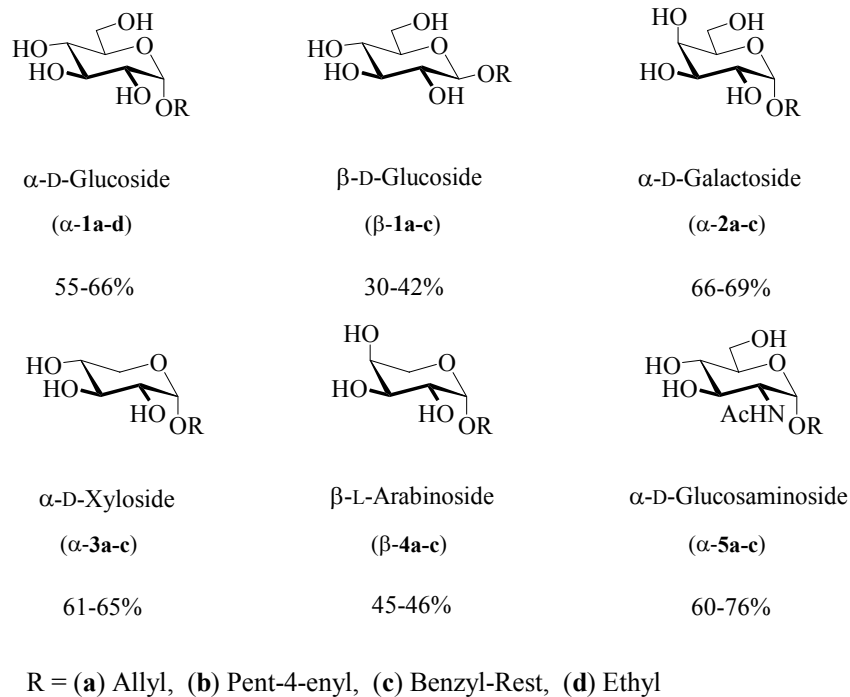
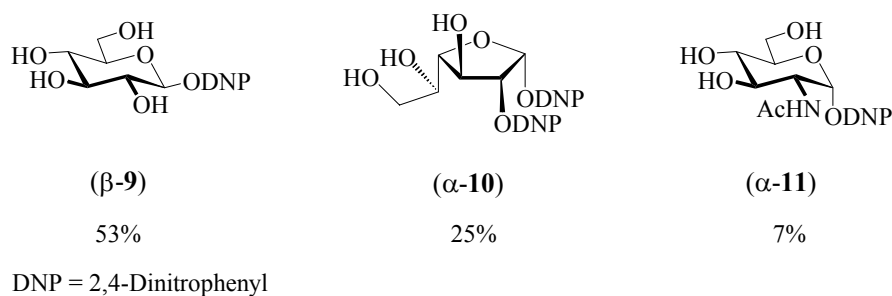


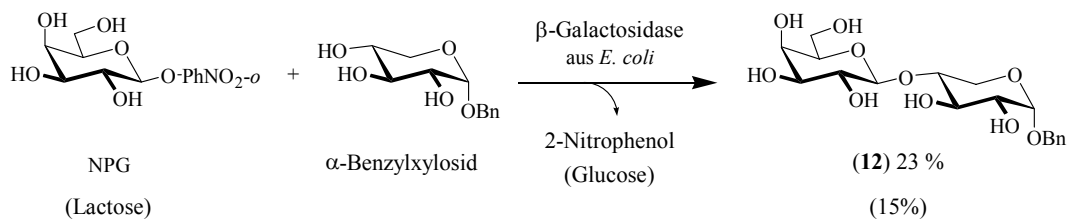
Abb. IV.1 Synthetisierte einfache Glycoside.

Das Rohpräparat der β -Galactosidase aus *A. oryzae* ist eine reiche Quelle für weitere Glycosidasen, die zur hydrolytischen Differenzierung von Anomerengemischen der Glycoside aus D-Xylose, L-Arabinose, N-Acetyl-D-glucosamin und D-Glucose genutzt wurden. Da diese Nebenzymen auf Grund von Verunreinigungen des Rohpräparats nur in geringer Menge vorhanden sind, wurde das preiswerte Proteinpräparat in größerer Menge verwendet. Die Temperatur (37°C) wurde bei den hydrolytischen Reaktionen angehoben, damit die Produktivität der Glycosidasen mit geringen spezifischen Aktivitäten erhöht wurde. Hierbei konnten α/β -Anomerengemische von D-Xylosiden, L-Arabinosiden, N-Acetyl-D-glucosaminosiden und D-Glucosiden partiell hydrolysiert werden, wobei die entsprechenden Glycoside (α -3a-c, β -4a-c, α -5a-c bzw. α -1a-c) in Ausbeuten zwischen 45 und 76% rein erhalten wurden (Abb. IV.1).

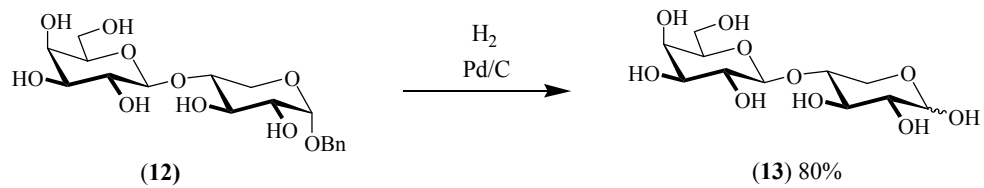
Durch neuere Herstellungsmethoden wurde die Synthese von 2,4-Dinitrophenyl- β -glycosiden versucht. Hierbei wurde freie β -D-Glucose mit 2,4-Dinitrofluorobenzol (DNFB) unter basischen aprotischen Bedingungen umgesetzt und das 2,4-Dinitrophenyl- β -glucosid (β -9) in 53% Ausbeute gewonnen. Unter denselben Bedingungen wurde mit Galactose jedoch nicht das β -Arylgalactosid sondern das disubstituierte 1,2-Diaryl- α -galactosid (α -10) in furanosider Form in 25% Ausbeute erhalten. *N*-Acetyl-D-glucosamin wurde ebenfalls mit DNFB aryliert, wobei 2,4-Dinitrophenyl-2-acetamido- α -glucosid (α -11) in 7% Ausbeute erhalten wurde.



C) Das erzeugte α -Benzyl-D-xylosid (α -3c) konnte als Akzeptor in die Synthese des wichtigen Disaccharids β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Xyl durch enzymatische Transglycosylierung eingesetzt werden. Die Transferreaktion wurde mit β -Galactosidase aus *E. coli* unter hoher Regioselektivität durchgeführt. Als Donor wurde sowohl das 2-Nitrophenyl- β -galactosid als auch die preisgünstige Lactose eingesetzt, wobei das Disaccharid β -Gal-(1 \rightarrow 4)- α -Xyl-OBn (**12**) in Ausbeuten von 23 bzw. 15% erhalten wurde.



Nach Entschützen des Disaccharids **12** durch Abhydrieren der Benzylschutzgruppe wurde das freie β -Galactosyl-(1 \rightarrow 4)-Xylopyranosid (**13**) in 80% Ausbeute gewonnen.



V. Experimenteller Teil

1. Geräte und Reagenzien

Präparative Arbeiten

Für alle Reaktionen und Chromatographien werden destillierte Lösungsmittel verwendet. Säulenchromatographien an Kieselgel und Aktivkohle/Kieselgur werden in der Regel unter leicht erhöhtem Druck durchgeführt. Lösungsmittel werden bei reduziertem Druck bei einer Wasserbadtemperatur von 30°C im Rotationsverdampfer entfernt. Wasser als Lösungsmittel wird schonend bei 2 mbar in einem Rotationsverdampfer mit -15°C kaltem Kühlmittel entfernt. Die enzymatische Reaktionen in kleinem Maßstab werden in Thermomixer bei RT oder 37°C durchgeführt. Versuchsansätze partieller Hydrolyse in großem Maßstab werden in Glaskolben verschiedener Größe bei RT auf einem Schütter oder bei 37°C im Schüttelbad durchgeführt. Der Reaktionsfortgang der partiellen Hydrolysen wird durch DC-Kontrolle (EE/Isopropanol/H₂O, 9/4/2) für die Glycoside **1c**, **2a-c** und **5a-c** oder durch ¹H-NMR-Analyse für die weitere Glycoside **1a-b**, **1d**, **3a-c** und **4a-c** mittels **AVV 4-AVV 7** verfolgt.

NMR Spektroskopie¹H-NMR:

300 MHz, Bruker AC-300

300 MHz, Bruker ARX-300

500 MHz, Bruker AVANCE 500

¹³C-NMR:

75.4 MHz, Bruker AC-300

75.4 MHz, Bruker ARX-300

125.7 MHz, Bruker AVANCE 500

Als interner Standard wird für die Messungen in D₂O Natrium-3-trimethylsililpropionat (TPS, 0.00 ppm) und für andere deuterierte Lösungsmittel Tetramethylsilan (TMS, 0.00 ppm) verwendet.

Massenspektrometrie

Bruker Esquire-LC, ESI

Drehwerte

Perkin Elmer 241, 10 cm Küvette (1 ml), Na-Lampe bei einer Wellenlänge von 589 nm.

Ultrafiltration

Amicon 8400, Membran YM 10

pH-Meter

Calimatic 761, Fa. Knick

Thermomixer

Thermomixer 5436, Fa. eppendorf

Säulenchromatographie

Kieselgel 60

Korngröße 0.063-0.200 mm, Fa. Merck

C₁₈-Kieselgel 100 (Reversed-Phase)

Korngröße 0.040-0.063 mm, Fa. Fluka

Kieselgur/Aktivkohle

Fa. Fluka/Merck

DünnschichtchromatographieKieselgel 60 F₂₅₄ (Aluminiumfolien)

Korngröße 0.2 mm, Fa. Merck

Detektion durch Anisaldehydreagenz (200 ml Ethanol, 5.5 ml Anisaldehyd, 7.5 ml H₂SO₄, 2.2 ml Essigsäure)

IonentauscherDowex 50 WX 8 (H⁺-Form, 100-200 mesh)

Fa. SERVA

Dowex 1 X 8 (Cl⁻-Form, 100-200 mesh)

Fa. SERVA

Verwendete Enzyme

EC Nummer	Enzym	Lieferant
EC 3.2.1.1	α -Amylase aus <i>Aspergillus oryzae</i>	Sigma, A-6211
EC 3.4.22.3	Ficin aus Gummibaum (<i>Fig Tree Latex</i>)	Sigma, F-4165
EC 3.2.1.23	β -Galactosidase aus <i>Aspergillus oryzae</i>	Sigma, G-7138
EC 3.2.1.23	β -Galactosidase aus <i>Aspergillus oryzae</i>	Sigma, G-5160
EC 3.2.1.23	β -Galactosidase aus <i>Escherichia coli</i>	Sigma, G-6008
EC 3.2.1.23	β -Galactosidase aus <i>Escherichia coli</i>	Roche, 150797
EC 3.2.1.20	α -Glucosidase aus Hefe	Fluka, 63412
EC 3.2.1.21	β -Glucosidase aus Mandeln	Fluka, 49290
EC 3.2.1.31	β -Glucuronidase aus Rinderleber	Sigma, G-0251
EC 3.2.1.31	β -Glucuronidase aus <i>Scallop-Muscheln</i>	Sigma, G-8635

Puffer

Phosphat-Puffer

Lösung A

200 mM NaH₂PO₄

Lösung B

200 mM Na₂HPO₄

Lösung A (ml oder μl)	Lösung B (ml oder μl)	pH
100	-	4.5
93.5	6.5	5.7
51.0	49.0	6.8

Phosphat-Puffer (1 mmol MgCl₂)

50 mM NaH₂PO₄, pH 7.0
1 mM MgCl₂

5 mM Mercaptoethanol

2. Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: Acetalisierung

Eine Lösung des Monosaccharids und des jeweiligen Alkohol wird mit Ionentauscher in H^+ -Form (10g pro 100 mmol Substrat) unter Rühren erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung (DC-Kontrolle; $CH_2Cl_2/MeOH$, 17/3) wird der Ionentauscher abfiltriert und mit wenig Alkohol gewaschen. Der überschüssige Alkohol wird im Vakuum entfernt und der verbleibende gelbliche Rückstand durch Extraktion gereinigt. Die wässrige Phase wird im Vakuum eingengt und das Anomerenverhältnis durch 1H -NMR-Spektroskopie bestimmt.

AAV 2: Acetalisierung

Eine Lösung des Monosaccharids und des Alkohol wird mit Ionentauscher Dowex in H^+ -Form (10g pro 100 mmol Substrat) unter Rühren erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung unter DC-Kontrolle ($EE/Isopropanol/H_2O$, 9/4/2) wird der Ionentauscher abfiltriert. Überschüssiger Alkohol wird durch Extraktion mit Diethylether entfernt. Die wässrige Phase wird im Vakuum eingengt und das Anomerenverhältnis durch 1H -NMR-Analyse bestimmt.

AAV 3: Acetalisierung

Eine Lösung von *N*-Acetyl-D-glucosamin und Alkohol wird mit BF_3 -Etherat (5 mmol pro 35 mmol Substrat) unter Rühren auf $100^\circ C$ erhitzt. Nach 2h wird die Lösung durch Zugabe von Ionentauscher in Cl^- -Form neutralisiert. Der Ionentauscher wird abfiltriert und überschüssiger Alkohol durch Extraktion mit Diethylether entfernt. Die wässrige Phase wird im Vakuum eingengt und das Anomerenverhältnis durch 1H -NMR-Spektroskopie analysiert.

AAV 4: Partielle Hydrolyse mit α -Glucosidase aus Hefe

Das α,β -Glucosid wird im Phosphat-Puffer (200 mM, pH 6.8) gelöst und mit α -Glucosidase versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für 48h bei RT geschüttelt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand durch Chromatographie an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 17/3) gereinigt.

Alternativ kann zur Abtrennung der β -Pent-4-enyl- und β -Benzyl-D-glucoside RP-Chromatographie verwendet werden. Der freie Alkohol wird mit Diethylether extrahiert. Die wässrige Lösung wird daraufhin über die RP-Kieselgelsäule gegeben und mit Wasser eluiert, wobei die Glucose und der Phosphat-Puffer herausgewaschen werden. Durch Zugabe von Ethanol wird das reine Glucosid eluiert.

AAV 5: Partielle Hydrolyse mit β -Glucosidase aus Mandeln

Im Phosphatpuffer wird das α,β -Glucosid gelöst und mit β -Glucosidase inkubiert. Nach der vollständige Umsetzung wird der freigesetzte Alkohol durch Extraktion entfernt und die wässrige Phase im Vakuum eingengt. Restliches Wasser wird durch azeotrope Destillation mit absolutem Aceton entfernt. Der erhaltene Feststoff wird im Hochvakuum 24h lang getrocknet, mit Mörser pulverisiert und umkristallisiert.

AAV 6: Partielle Hydrolyse mit β -Galactosidase aus *A. oryzae*

Zu einer 115 mM Lösung des α,β -Galactosids in Phosphatpuffer (200 mM, pH 4.5) gibt 72 U β -Galactosidase pro mmol Substrat. Die Reaktionslösung wird bei RT geschüttelt. Nach der erfolgreichen Umsetzung wird der freie Alkohol mit Ether extrahiert und die wässrige Lösung im Vakuum eingengt. Der verbleibende Rückstand wird erst mit Aceton und dann im Hochvakuum (24h) getrocknet. Anschließend wird der erhaltene Feststoff durch Umkristallisation gereinigt.

AAV 7: Partielle Hydrolyse mit β -Galactosidase aus *A. oryzae*

Das α,β -Glycosidgemisch wird in einer gepufferter Lösung (200 mM, pH 4.5) suspendiert und mit dem rohen Proteinpräparat der β -Galactosidase inkubiert. Die Reaktionslösung wird bei 37°C langsam gerührt und nach der erfolgter Umsetzung der freie Alkohol mit Diethylether extrahiert. Die Lösung wird im Vakuum eingeeengt und das restliche Wasser mit Aceton durch azeotrope Destillation entfernt. Nach Trocken im Hochvakuum wird der Rückstand durch umkristallisiert.

AAV 8: Arylierung

Zu DMF (4ml pro mmol Substrat) werden das Monosaccharid, 2,4-Dinitrofluorbenzol und ein Äquivalent Cosolvens gegeben. Nach der Zugabe von 1 Äquivalent NaH wird die Reaktion bei RT unter N₂-Atmosphäre gerührt. Nach Umsetzung des Monosaccharids wird die Lösung mit Kationentauscher (1g/mmol Base) neutralisiert, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Anschließend wird der Rückstand durch Chromatographie aufgereinigt.

AAV 9: Peracetylierung

Freies Disaccharid und Acetanhydrid werden in absolutem Pyridin (10 ml/mmol) gelöst und bei Raumtemperatur 24 h gerührt. Nach Zugabe von Wasser (10 ml/mmol Disaccharid) wird die Reaktionslösung mit Essigester extrahiert. Die erhaltene organische Phase wird mit Wasser, 1N HCl, gesättigter NaHCO₃-Lösung, gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Die Lösung wird im Vakuum eingeeengt. Das peracetylierte Disaccharid wird durch Umkristallisation gereinigt.

3. Synthesen

3.1. α,β -Allyl-D-glucopyranosid (1a)

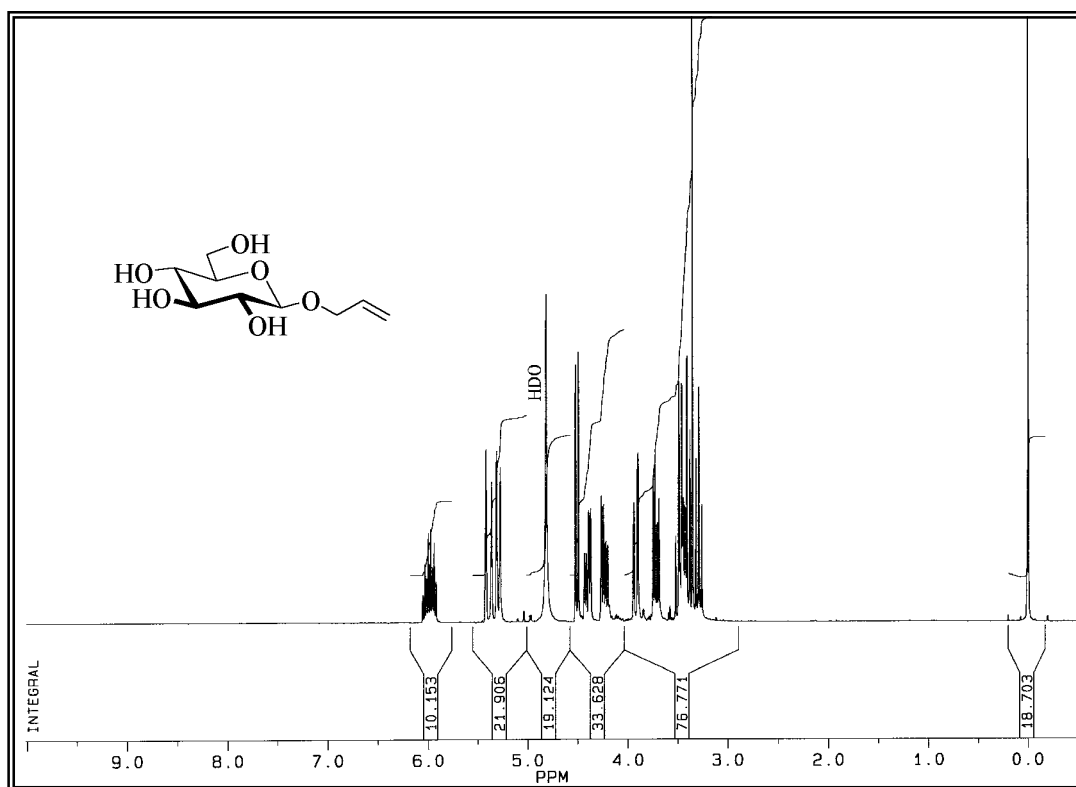
Acetalisierung von D-Glucose mit Allylkohol nach AAV 1

Ansatz:	25g (139 mmol) Glc, 300 ml Allylkohol
	2h bei 90°C
Reinigung:	Extraktion mit Essigester
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O):	$\delta = 4.96$ (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 3.8$), 4.50 (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 8.0$)
$\alpha:\beta$ -Anomerenverhältnis:	4.5:2.5
Isolierte Ausbeute:	29.4g (96 %) als farbloser Feststoff

3.1.1. β -Allyl-D-glucopyranosid (β -1a)

Partielle Hydrolyse von 1a nach AVV 4

Ansatz:	0.28g (1.3 mmol)
α -Glucosidase:	325 U (5 mg)
Phosphat-Puffer:	3 ml, pH 6.8
Isolierte Ausbeute:	100 mg (35 %) als farbloser Feststoff
R_f -Wert:	0.25, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (17:3)



¹H-NMR (300 MHz, D₂O):

δ = 6.0 (dddd, 2-H), 5.39 (dd, 3-H_E), 5.29 (dd, 3-H_Z), 4.51 (d, 1'-H), 4.4 (ddd, 1-H_a), 4.23 (ddd, 1-H_b), 3.92 (dd, 6'-H_a), 3.72 (dd, 6'-H_b) 3.5-3.37 (m, 3'-H, 5'-H 4'-H), 3.29 (dd, 2'-H); $J_{1a, 1b} = 12.7$, $J_{1a, 2} = 5.7$, $J_{1a, 3} = J_{1b, 3} = 1.0$, $J_{1b, 2} = 6.1$, $J_{2, 3Z} = 10.4$, $J_{2, 3E} = 17.2$, $J_{3E, 3Z} = 0.7$, $J_{1', 2'} = J_{2', 3'} = 8.4$, $J_{5', 6a'} = 1.0$, $J_{5', 6b'} = 5.4$, $J_{6a', 6b'} = 12.2$ Hz.

¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O):

δ = 136.1 (C-2), 121.5 (C-3), 104.0 (C-1'), 78.7 (C-5'), 78.6 (C-3'), 75.9 (C-2'), 73.4 (C-1), 72.5 (C-4'), 63.6 (C-6').

MS (ESI):

m/z (%) = 243.1 (100) [M+Na]⁺.

C₉H₁₆O₆: 220.09.

3.1.2. α -Allyl-D-glucopyranosid (α -1a)

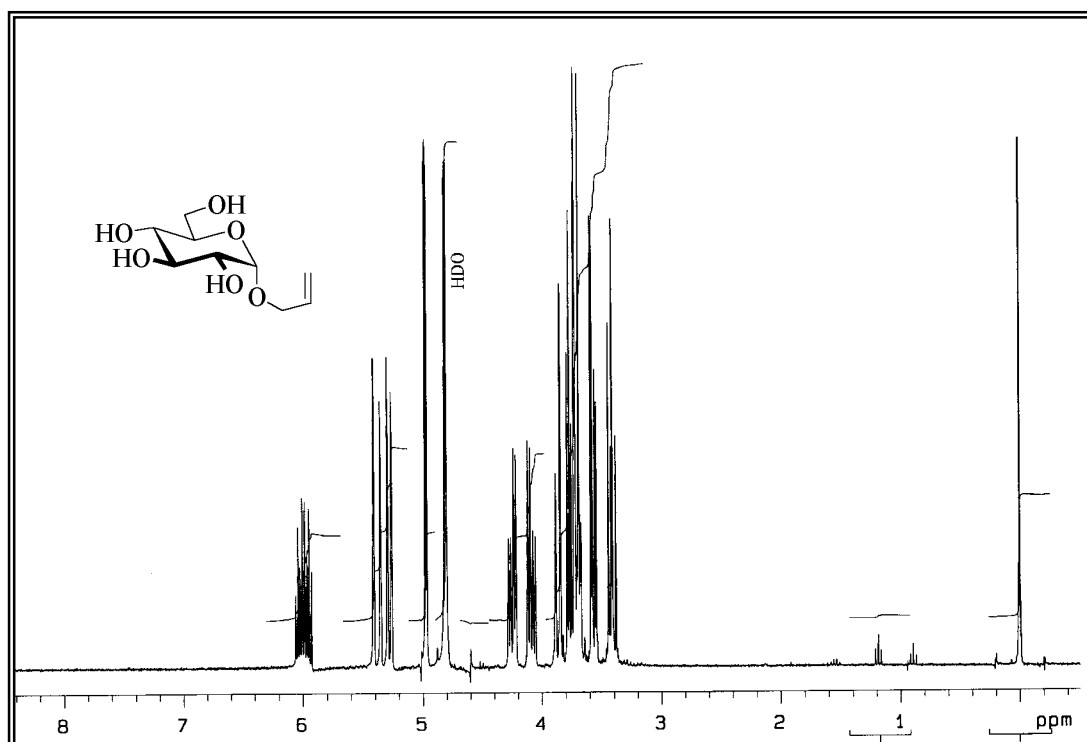
Acetalisierung nach AAV 1 (s.o. 3.1.)

Partielle Hydrolyse von 1a mit β -Glucosidase nach AVV 5

Ansatz:	7g (31.8 mmol)
β -Glucosidase:	196 U (33.8 mg)
Phosphat-Puffer:	86 ml, pH 5.7
	2d
Umkristallisation:	aus erst Ethanol und dann aus Aceton
Isolierte Ausbeute:	4.5g (64 %) als farbloser Feststoff
R_f -Wert:	0.25, CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (17:3)

Partielle Hydrolyse von 1a mit β -Galactosidase nach AVV 7

Ansatz:	7g (31.8 mmol)
β -Galactosidase:	17.820 U (1.98 g)
Phosphat-Puffer:	270 ml, pH 4.5
	2d
Isolierte Ausbeute:	4.5g (64 %)

 **^1H -NMR (300 MHz, D_2O):**

$\delta = 6.0$ (dddd, 2-H), 5.37 (dd, 3- H_E), 5.27 (dd, 3- H_Z), 4.96 (d, 1'-H), 4.24 (dd, 1- H_a), 4.08 (dd, 1- H_b), 3.87-3.66 (m, 6'- H_ab , 3'-H, 5'-H), 3.56 (dd, 2'-H), 3.42 (dd, 4'-H); $J_{1\text{a}, 1\text{b}} = 12.8$, $J_{1\text{a}, 2} = 6.0$, $J_{1\text{b}, 2} = 5.6$, $J_{2, 3\text{Z}} = 10.4$, $J_{2, 3\text{E}} = 17.2$, $J_{3\text{E}, 3\text{Z}} = 0.8$, $J_{1', 2'} = 3.7$, $J_{2', 3'} = 9.7$, $J_{3', 4'} = J_{4', 5'} = 9.3$ Hz.

 ^{13}C -NMR (75.4 MHz, D_2O):

$\delta = 136.3$ (C-2), 121.0 (C-3), 100.1 (C-1'), 75.9 (C-3'), 74.6 (C-5'), 74.0 (C-2'), 72.4 (C-4'), 71.2 (C-1), 63.3 (C-6').

MS (ESI):

m/z (%) = 242.9 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_6$: 220.09.

3.2. α,β -Pent-4-enyl-D-glucopyranosid (1b)

Acetalisierung von D-Glucose mit 4-Pentenol nach AAV 2

Ansatz: 2g (11.1 mmol) Glc, 12 ml 4-Pentenol
1h bei 90°C

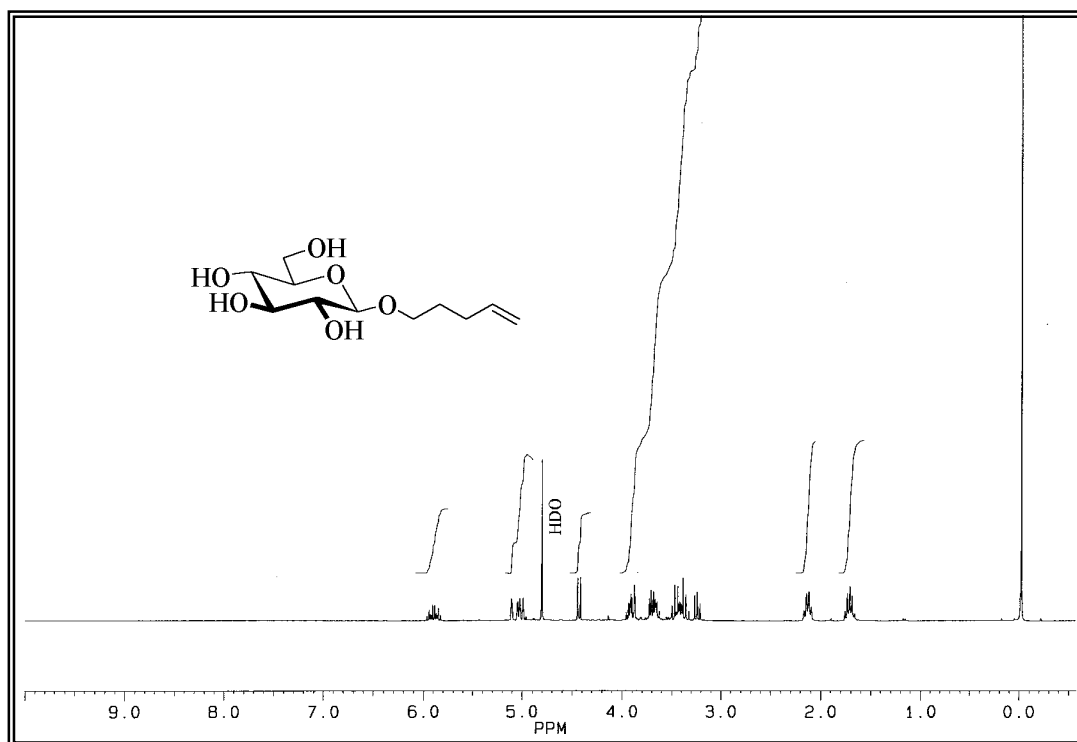
^1H -NMR (300 MHz, D_2O): $\delta = 4.90$ (d, 1'-H; $J_{1', 2'} = 3.8$), 4.44 (d, 1'-H; $J_{1', 2'} = 7.9$)

$\alpha:\beta$ -Anomerenverhältnis: 2:1

Isolierte Ausbeute: 2.7g (98%) als farbloser Feststoff

3.2.1. β -Pent-4-enyl-D-glucopyranosid (β -1b)*Partielle Hydrolyse von 1b mit α -Glucosidase nach AVV 4*

Ansatz:	0.2g (0.8 mmol)
α -Glucosidase:	202 U (3.5 mg)
Phosphat-Puffer:	2 ml, pH 6.8
Isolierte Ausbeute:	65 mg (30%) als farbloser Feststoff
R_f -Wert:	0.30, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (17:3)

 **^1H -NMR (300 MHz, D_2O):**

δ = 5.91 (dddd, 4-H), 5.1 (m, 5- H_E), 5.0 (m, 5- H_Z), 4.44 (d, 1'-H), 3.93 (m, 1- H_ab), 3.71 (dd, 6'- H_a), 3.66 (m, 6'- H_b), 3.51-3.34 (m, 3'-H, 5'-H, 2'-H), 3.25 (t, 4'-H), 2.14 (m, 3- H_ab), 1.72 (m, 2- H_ab); $J_{3\text{a},4} = J_{3\text{b},4} = 6.7$, $J_{4,5\text{Z}} = 10.2$, $J_{4,5\text{E}} = 16.6$, $J_{1',2'} = 8.0$, $J_{3',4'} = J_{4',5'} = 8.5$, $J_{5',6\text{a}'} = 5.7$, $J_{6\text{a}',6\text{b}'} = 12.4$ Hz.

 ^{13}C -NMR (75.4 MHz, D_2O):

δ = 141.6 (C-4), 117.6 (C-5), 104.9 (C-1'), 78.7 (C-5'), 78.6 (C-3'), 75.9 (C-2'), 72.7 (C-1), 72.4 (C-4'), 63.5 (C-6'), 32.1 (C-3), 30.8 (C-2).

MS (ESI):

m/z (%) = 271.0 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_6$: 248.13.

3.2.2 α -Pent-4-enyl-D-glucopyranosid (α -1b)

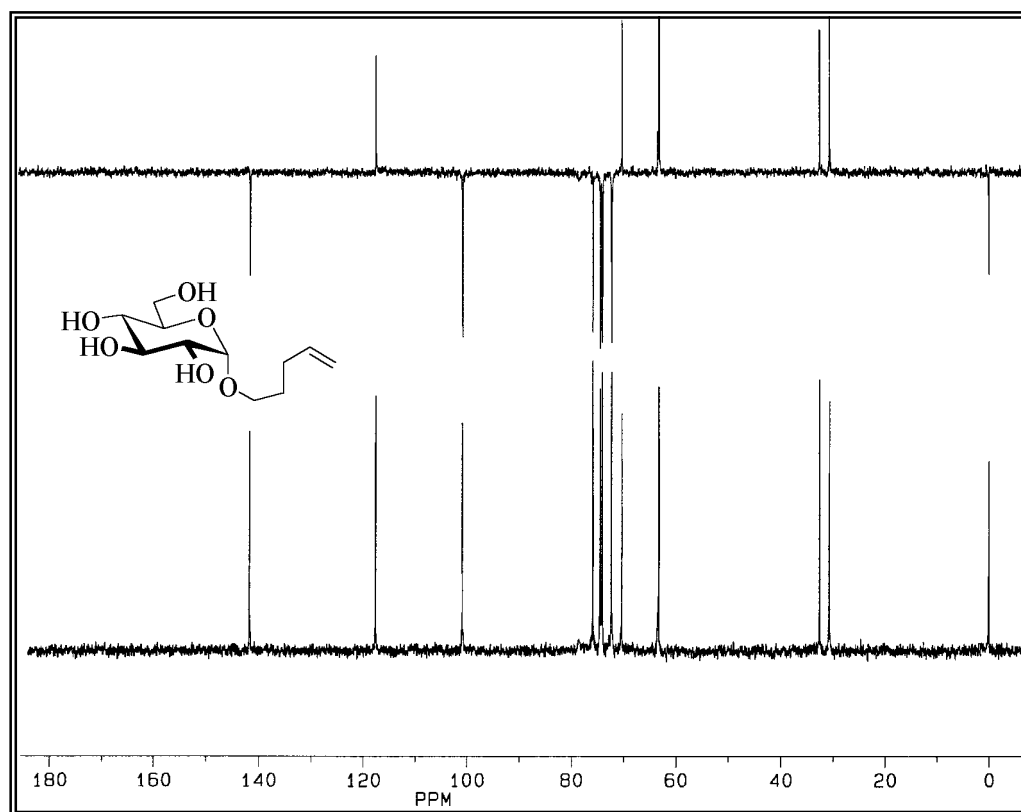
Acetalisierung nach *AAV 2* (s.o. 3.2.)

Partielle Hydrolyse von 1b mit β -Glucosidase nach AVV 5

Ansatz: 1.7g (6.9 mmol)
 β -Glucosidase: 42.5 U (5.5 mg)
Phosphat-Puffer: 17 ml, pH 5.7
24h
Umkristallisation: aus erst Ethanol und dann aus Aceton
Isolierte Ausbeute: 1.13 g (66 %) als farbloser Feststoff
 R_f -Wert: 0.30, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (17:3)

Partielle Hydrolyse von 1b mit β -Galactosidase nach AVV 7

Ansatz: 1.2g (4.8 mmol)
 β -Galactosidase: 2.700 U (0.67 g)
Phosphat-Puffer: 40 ml, pH 4.5
2d
Isolierte Ausbeute: 0.78g (66 %)



¹H-NMR (300 MHz, D₂O):

δ = 5.93 (dddd, 4-H), 5.10 (m, 5-H_E), 5.03 (m, 5-H_Z), 4.91 (d, 1'-H), 3.85 (dd, 6'-H_a), 3.8-3.65 (m, 6'-H_b, 3'-H, 5'-H, 2'-H), 3.58-3.50 (m, 1-H_{ab}), 3.41 (t, 4'-H), 2.15 (m, 3-H_{ab}), 1.75 (m, 2-H_{ab}); $J_{3a,4} = 6.7$, $J_{3b,4} = 6.5$, $J_{4,5Z} = 10.3$, $J_{4,5E} = 17.1$, $J_{1',2'} = 3.6$, $J_{3',4'} = 9.0$, $J_{4',5'} = 9.4$, $J_{5',6'} = 2$, $J_{6a',6b'} = 12.0$ Hz.

¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O):

δ = 141.8 (C-4), 117.6 (C-5), 100.9 (C-1'), 76.0 (C-3'), 74.6 (C-5'), 74.2 (C-2'), 72.4 (C-4'), 70.4 (C-1), 63.4 (C-6'), 32.5 (C-3), 30.7 (C-2).

MS (ESI):

m/z (%) = 271.3 (100) [M+Na]⁺.

C₁₁H₂₀O₆: 248.13.

3.3. α,β -Benzyl-D-glucopyranosid (1c)

Acetalisierung von D-Glucose mit Benzylalkohol nach AAV 2

Ansatz: 25g (139 mmol) Glc, 520 ml Benzylalkohol
5h bei 100°C

¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ = 5.03 (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 4.0$), 4.53 (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 7.7$)

$\alpha:\beta$ -Anomerenverhältnis: 4:3

Isolierte Ausbeute: 23.7g (63 %) als farbloser Feststoff

3.3.1. β -Benzyl-D-glucopyranosid (β -1c)

Partielle Hydrolyse von 1c mit α -Glucosidase nach AVV 4

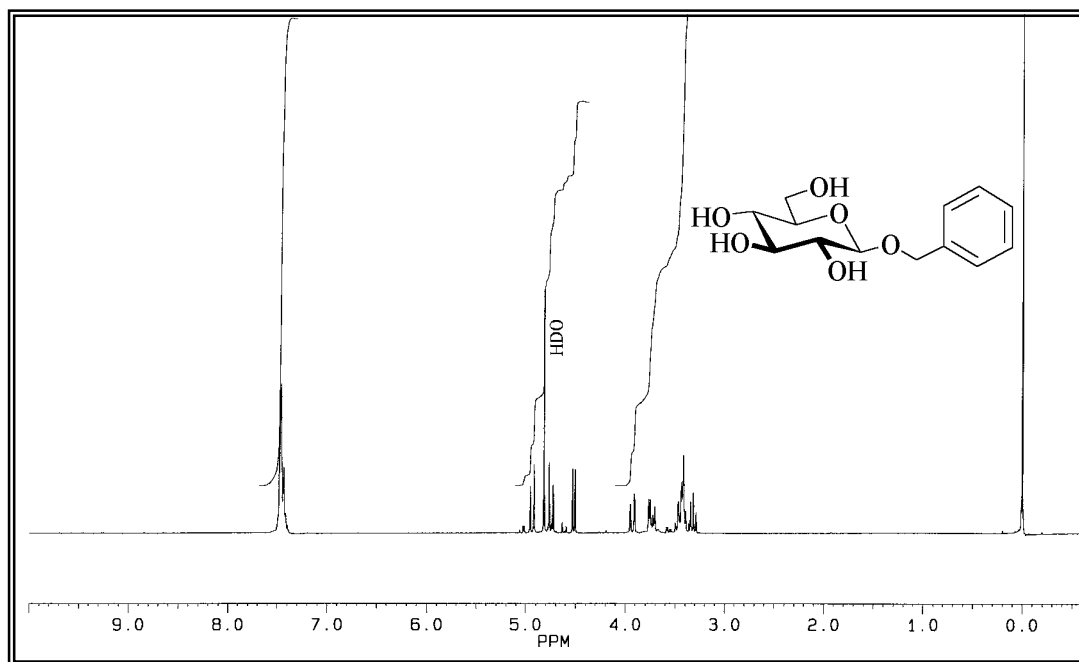
Ansatz: 0.2g (0.7 mmol)

α -Glucosidase: 274 U (4.8 mg)

Phosphat-Puffer: 2 ml, pH 6.8

Isolierte Ausbeute: 84 mg (42 %) als farbloser Feststoff

R_f-Wert: 0.34, CH₂Cl₂/CH₃OH (17:3)

**¹H-NMR (300 MHz, D₂O):**

δ = 7.47-7.42 (m, H_{Ar}), 4.93 (d, 1-H_a), 4.74 (d, 1-H_b), 4.51 (d, 1'-H), 3.92 (dd, 6'-H_a), 3.74 (dd, 6'-H_b), 3.7 (m, 3'-H), 3.5-3.39 (m, 5'-H, 2'-H), 3.32 (t, 4'-H); $J_{1a, 1b}$ = 11.6, $J_{1', 2'}$ = 7.9, $J_{3', 4'}$ = $J_{4', 5'}$ = 8, $J_{5', 6a'}$ = 1.6, $J_{5', 6b'}$ = 4.7, $J_{6a', 6b'}$ = 11.6 Hz.

¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O):

δ = 139.4 (C_{Ar}), 131.5 (C_{Ar}), 131.2 (C_{Ar}), 131.0 (C_{Ar}), 103.9 (C-1'), 78.7 (C-3'), 78.6 (C-5'), 75.9 (C-2'), 74.2 (C-1), 72.4 (C-4'), 63.5 (C-6').

MS (ESI):

m/z (%) = 292.7 (100) [M+Na]⁺.

C₁₃H₁₈O₆: 270.11.

3.3.2. α -Benzyl-D-glucopyranosid (α -1c)

Acetalisierung nach AAV 2 (s.o. 3.3.)

Partielle Hydrolyse von 1c mit β -Glucosidase nach AVV 5

Ansatz: 8g (29.6 mmol)

β -Glucosidase: 186 U (32 mg)

Phosphat-Puffer: 80 ml, pH 5.7

24h

Umkristallisation: aus Aceton

Isolierte Ausbeute: 4.4g (55 %) als farbloser Feststoff

R_f -Wert: 0.34, CH₂Cl₂/CH₃OH (17:3)

Partielle Hydrolyse von 1c mit β -Galactosidase nach AVV 7

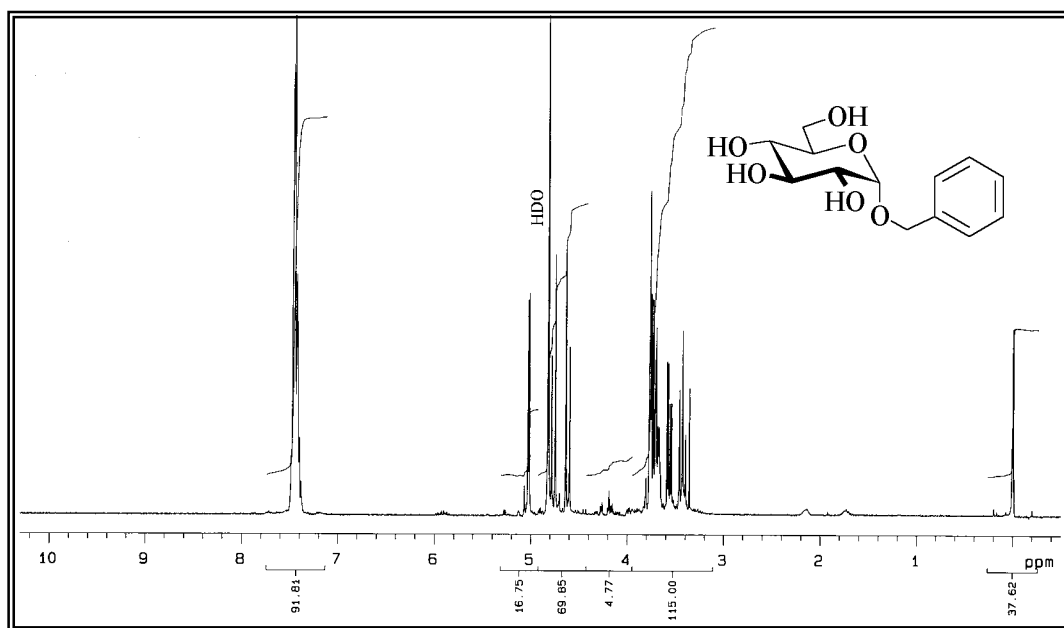
Ansatz: 2.1g (7.8 mmol)

 β -Galactosidase: 4.500 U (0.5 g)

Phosphat-Puffer: 68 ml, pH 4.5

2d

Isolierte Ausbeute: 1.1g (53 %)

 **^1H -NMR (300 MHz, D_2O):**

δ = 7.49-7.38 (m, H_{Ar}), 5.03 (d, 1'-H), 4.74 (d, 1- H_a), 4.62 (d, 1- H_b), 3.77-3.66 (m, 6'- H_{ab} , 3'-H, 5'-H), 3.56 (dd, 2'-H), 3.43 (t, 4'-H); $J_{1a, 1b} = 11.7$, $J_{1', 2'} = 3.8$, $J_{2', 3'} = 9.8$, $J_{3', 4'} = J_{4', 5'} = 9.3$ Hz.

 ^{13}C -NMR (75.4 MHz, D_2O):

δ = 139.9 (C_{Ar}), 131.6 (C_{Ar}), 131.4 (C_{Ar}), 131.1 (C_{Ar}), 100.5 (C-1'), 75.9 (C-3'), 74.8 (C-5'), 74.1 (C-2'), 72.5 (C-1), 72.4 (C-4'), 63.2 (C-6').

MS (ESI):

m/z (%) = 293 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_6$: 270.11.

3.4. α,β -Ethyl-D-glucopyranosid (1d)*Acetalisierung von D-Glucose mit Ethanol nach AAV 1*

Ansatz: 300g (1.660 mmol) Glc, 3l Ethanol

16h bei 80°C

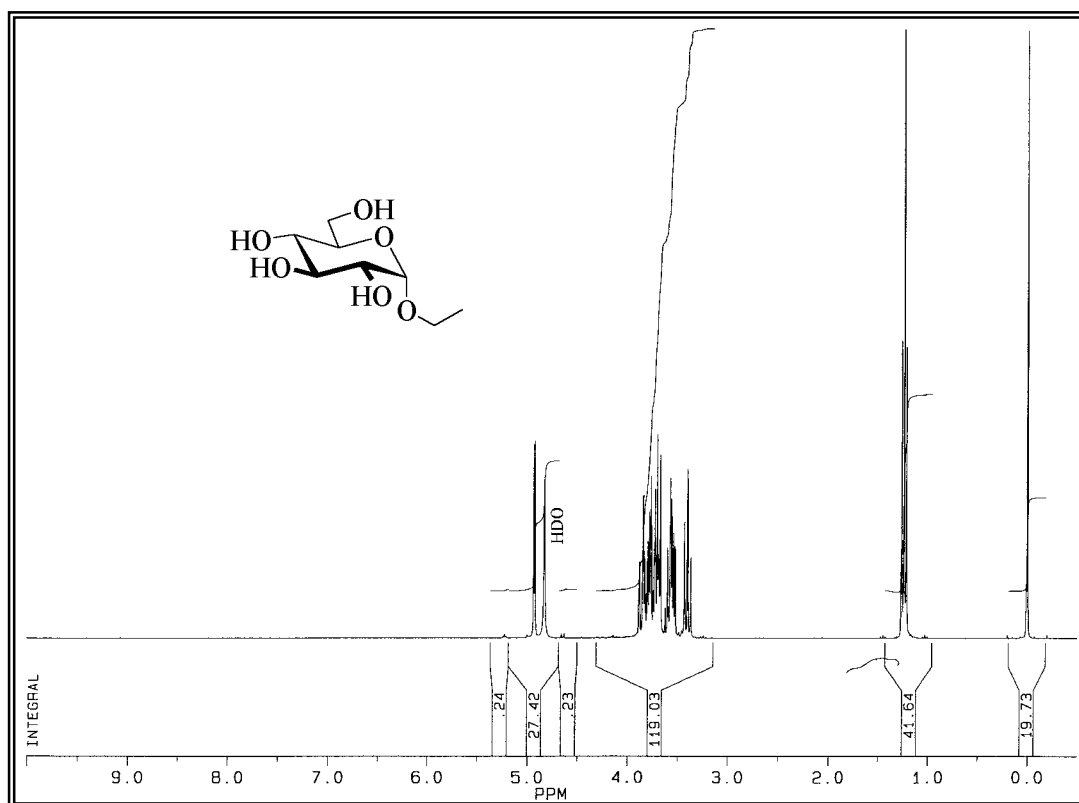
Reinigung: Extraktion mit Essigester

 ^1H -NMR (300 MHz, D_2O): δ = 4.92 (d, 1'-H; $J_{1', 2'} = 3.7$), 4.46 (d, 1'-H; $J_{1', 2'} = 7.9$) α,β -Anomerenverhältnis: 2:1

Isolierte Ausbeute: 343g (99%) als farbloser Feststoff

3.4.1. α -Ethyl-D-glucopyranosid (α -1d)*Partielle Hydrolyse von 1d mit β -Glucosidase nach AVV 5*

Ansatz:	200g (0.96 mol)
β -Glucosidase:	3.900 U (0.5 g)
Phosphat-Puffer:	2.4l (100 mM, pH 5.5)
Reaktionsdauer:	10d bei 37°C
Umkristallisation:	erst aus MeOH und dann EtOH und dann CH ₃ CN
Isolierte Ausbeute:	127g (64%) als farbloser Feststoff
R_f -Wert:	0.18, CH ₂ Cl ₂ /MeOH (17:3)
Schmelzpunkt:	101-103°C (Acetonitril)
Drehwert:	$[\alpha]_D^{20} = +1.36$ (c = 1.0, Wasser)

 **$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O):**

$\delta = 4.92$ (d, 1'-H), 3.85 (dd, 6'-H_a), 3.82-3.72 (m, 2H), 3.72-3.66 (m, 2H), 3.64-3.52 (m, 2H), 3.39 (t, 4'-H), 1.23 (t, 2-H); $J_{1,2} = 7.1$, $J_{1',2'} = 3.7$, $J_{5',6a'} = 1.7$, $J_{6a',6b'} = 11.8$, $J_{3',4'} = J_{4',5'} = 9.2$.

 $^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, D_2O):

$\delta = 100.6$ (C-1'), 75.9 (C-3'), 74.4 (C-5'), 74.0 (C-2'), 72.4 (C-4'), 66.6 (C-1), 63.4 (C-6'), 16.9 (C-2).

MS (ESI): m/z (%): 231.1 (100) $[M+Na]^+$. $C_8H_{16}O_6 = 208.21$.**3.5. α,β -Docosyl-D-glucopyranosid (1e)***Acetalisierung von D-Glucose mit 1-Docosanol*

In einer Mischung aus 10 ml DMF und 10 ml CH_2Cl_2 werden 0.5g D-Glucose (2.8 mmol), 6g 1-Docosanol (18.4 mmol) und 2.5 ml BF_3 -Etherat (19 mmol) gegeben. Die Lösung wird 24h lang auf 65°C erhitzt. Das Lösungsmittel und flüchtige BF_3 -Etherat werden im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand an Kieselgel ($CHCl_3/MeOH$, 10:1) aufgereinigt.

 $\alpha:\beta$ -Anomerenverhältnis: 1:2

Isolierte Ausbeute: 1.17g (87 %) als farbloser Feststoff

 R_f -Wert: zwei Flecke; 0.49 und 0.45, Benzol/MeOH (5:1) **1H -NMR (300 MHz, C_5D_5N):** $\delta = 4.92$ (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 3.7$), 4.46 (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 7.7$). **^{13}C -NMR (75.4 MHz, C_5D_5N):**

$\delta = 104.7$ (C-1 $_{\beta}'$), 100.3 (C-1 $_{\alpha}'$), 78.6 (C-5 $_{\beta}'$), 78.5 (C-3 $_{\beta}'$), 75.5 (C-3 $_{\alpha}'$), 75.2 (C-5 $_{\alpha}'$), 74.3 (C-2 $_{\beta}'$), 73.9 (C-2 $_{\alpha}'$), 72.3 (C-4 $_{\alpha}'$), 71.7 (C-4 $_{\beta}'$), 69.9 (C-1 $_{\beta}$), 68.2 (C-1 $_{\alpha}$), 63.0 (C-6 $_{\alpha}'$), 62.8 (C-6 $_{\beta}'$), 32.1, 30.3, 30.0, 29.8, 29.6, 26.6, 26.5, 22.9, (C-2-21) 14.3 (CH₃).

MS (ESI): m/z (%): 511.4 (100) $[M+Na]^+$. $C_{28}H_{56}O_6 = 488.4$.**3.6. α,β -Allyl-D-galactopyranosid (2a)***Acetalisierung von D-Galactose mit Allylalkohol nach AAV I*

Ansatz: 25g (138 mmol) Gal, 300 ml Allylalkohol
2h bei 90°C

Reinigung: Extraktion mit Essigester

 1H -NMR (300 MHz, D_2O): $\delta = 5.0$ (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 3.1$), 4.45 (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 7.8$) $\alpha:\beta$ -Anomerenverhältnis: 2:1

Isolierte Ausbeute: 22.5g (74 %) als farbloser Feststoff

Nebenprodukt: Allyl-4,6-O-propyliden- α,β -D-galactopyranosid (**2a'**) 1H -NMR (300 MHz, D_2O): $\delta = 4.83$ (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 2.6$), 4.42 (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 7.9$) $\alpha:\beta$ -Anomerenverhältnis: 1:1

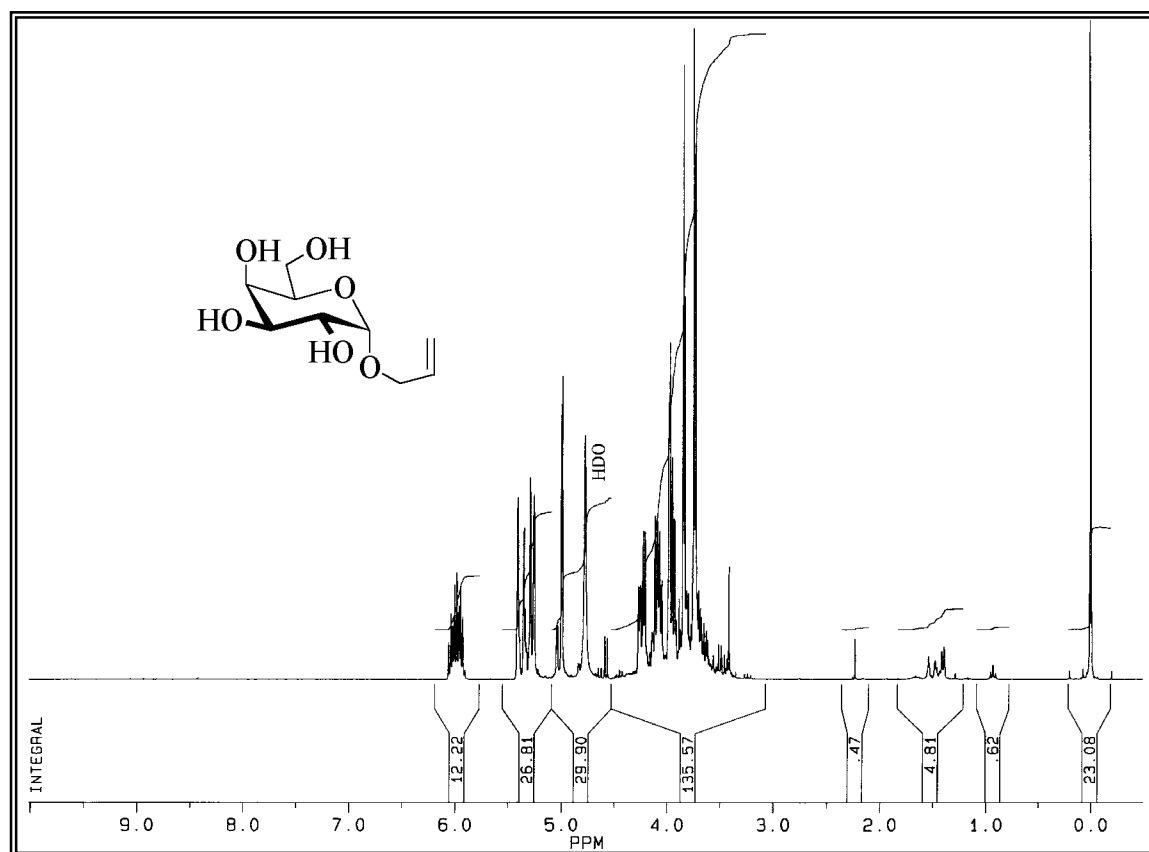
Isolierte Ausbeute: 9.5g (24 %) als gelblicher Sirup

3.6.1. α -Allyl-D-galactopyranosid (α -2a)*Partielle Hydrolyse von 2a mit β -Galactosidase nach AVV 6*

Ansatz: 7g (31.8 mmol)
 β -Galactosidase: 2.290 U (574 mg)
 Phosphat-Puffer: 273 ml, pH 4.5
 2d
 Umkristallisation: Ethanol
 Isolierte Ausbeute: 4.6g (66%) als farbloser Feststoff
 R_f -Wert: 0.27, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (17:3)

Partielle Hydrolyse von 2a' mit β -Galactosidase nach AVV 7

Ansatz: 1g (3.8 mmol)
 β -Galactosidase: 720 U (80 mg)
 Phosphat-Puffer: 5 ml, pH 4.5
 16h bei 37°C
 Kieselgur/Aktivkohle: Elution mit Wasser und dann EtOH/H₂O (2:98→20:80)
 Isolierte Ausbeute: 0.5g (50%)



¹H-NMR (300 MHz, D₂O):

δ = 6.0 (dddd, 2-H), 5.38 (dd, 3-H_E), 5.28 (dd, 3-H_Z), 4.99 (d, 1'-H), 4.23 (ddd, 1-H_a), 4.07 (ddd, 1-H_b), 3.99 (d, 4'-H), 3.97 (t, 5'-H), 3.84 (dd, 3'-H; m, 6'-H_a), 3.72 (dd, 2'-H; m, 6'-H_b); $J_{1a, 1b}$ = 12.8, $J_{1a, 2}$ = 5.5, $J_{1b, 2}$ = 6.3, $J_{1a, 3E}$ = $J_{1b, 3E}$ = 0.9, $J_{2, 3Z}$ = 10.4, $J_{2, 3E}$ = 17.4, $J_{3E, 3Z}$ = 1.5, $J_{1', 2'}$ = 3.1, $J_{2', 3'}$ = 10.4, $J_{3', 4'}$ = 3.0, $J_{5', 6a'}$ = $J_{5', 6b'}$ = 6.4 Hz.

¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O):

δ = 136.5 (C-2), 121.1 (C-3), 100.4 (C-1'), 73.8 (C-5'), 72.4 (C-3'), 72.1 (C-4'), 71.4 (C-1), 71.1 (C-2'), 64.1 (C-6').

MS (ESI):

m/z (%) = 243.1 (100) [M+Na]⁺.

C₉H₁₆O₆: 220.09.

3.7. α,β -Pent-4-enyl-D-galactopyranosid (2b)

Acetalisierung von D-Galactose mit 4-Pentenol nach AAV 2

Ansatz: 2g (11 mmol) Gal, 12 ml 4-Pentenol

2h bei 90°C

¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ = 4.93 (d, 1'-H; $J_{1', 2'}$ = 3.4), 4.38 (d, 1'-H; $J_{1', 2'}$ = 7.9)

$\alpha:\beta$ -Anomerenverhältnis: 2:1

Isolierte Ausbeute: 2.7g (99 %) als farbloser Feststoff

3.7.1. α -Pent-4-enyl-D-galactopyranosid (α -2b)

Partielle Hydrolyse von 2b mit β -Galactosidase nach AVV 6

Ansatz: 2.6g (10.5 mmol)

β -Galactosidase: 757 U (190 mg)

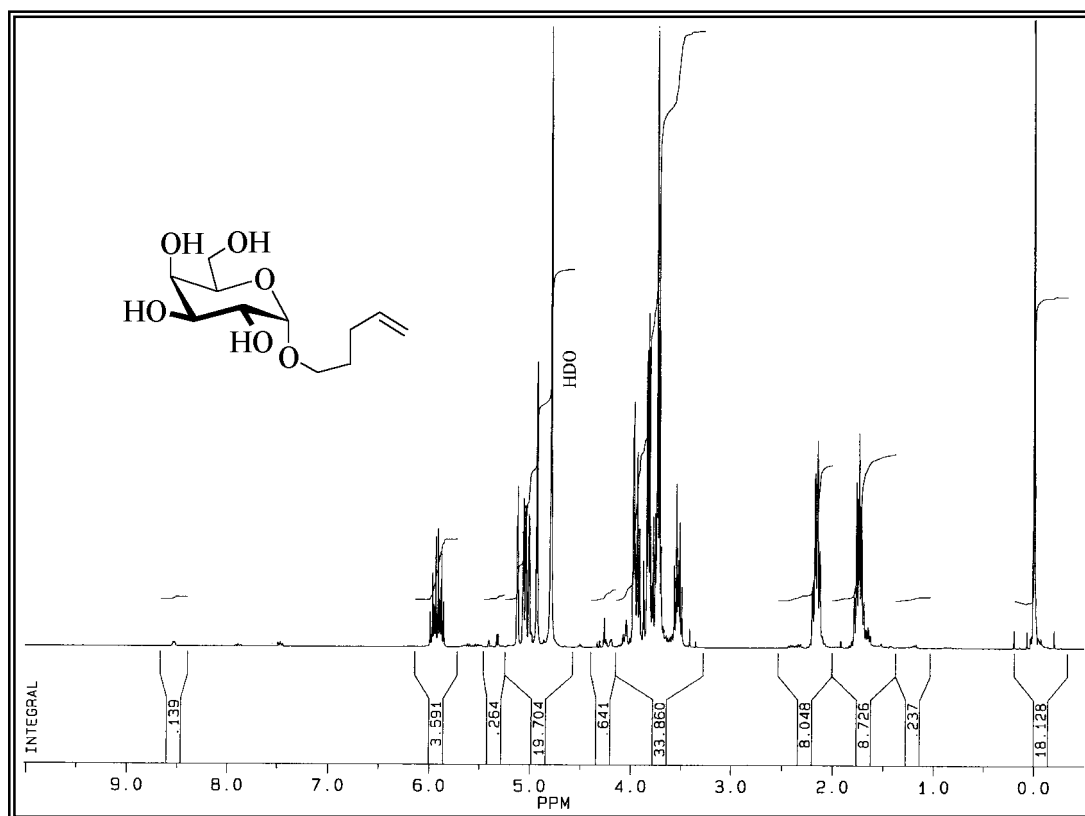
Phosphat-Puffer: 90 ml, pH 4.5

1d

Umkristallisation: aus Aceton

Isolierte Ausbeute: 1.7g (66 %) als farbloser Feststoff

R_f -Wert: 0.28, CH₂Cl₂/MeOH (17:3)

**¹H-NMR (300 MHz, D₂O):**

δ = 5.92 (dddd, 4-H), 5.09 (dddd, 5-H_E), 5.02 (m, 5-H_Z), 4.93 (d, 1'-H), 3.97 (d, 4'-H), 3.93 (t, 5'-H), 3.82 (dd, 3'-H, m, 6'-H_a), 3.73 (dd, 2'-H, m, 1-H_a, 6'-H_b), 3.53 (m, 1-H_b), 2.16 (m, 3-H_{ab}), 1.73 (m, 2-H_{ab}); $J_{3a,4} = 6.5$, $J_{3a,5E} = 1.6$, $J_{3b,4} = 6.6$, $J_{3b,5E} = 1.7$, $J_{4,5Z} = 10.3$, $J_{4,5E} = 17.1$, $J_{5E,5Z} = 1.8$, $J_{1',2'} = 3.4$, $J_{2',3'} = 11.4$, $J_{3',4'} = 2.8$, $J_{5',6a'} = 6.4$, $J_{5',6b'} = 6.5$ Hz.

¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O):

δ = 141.8 (C-4), 117.5 (C-5), 101.1 (C-1'), 73.6 (C-5'), 72.3 (C-3'), 72.0 (C-4'), 71.1 (C-2'), 70.4 (C-1), 63.9 (C-6'), 32.5 (C-3), 30.6 (C-2).

MS (ESI):

m/z (%) = 271.2 (100) [M+Na]⁺.

C₁₁H₂₀O₆: 248.13.

3.8. α,β -Benzyl-D-galactopyranosid (2c)

Acetalisierung von D-Galactose mit Benzylalkohol nach AAV 2

Ansatz: 5g (28 mmol) Gal, 60 ml Benzylalkohol
2h bei 90°C

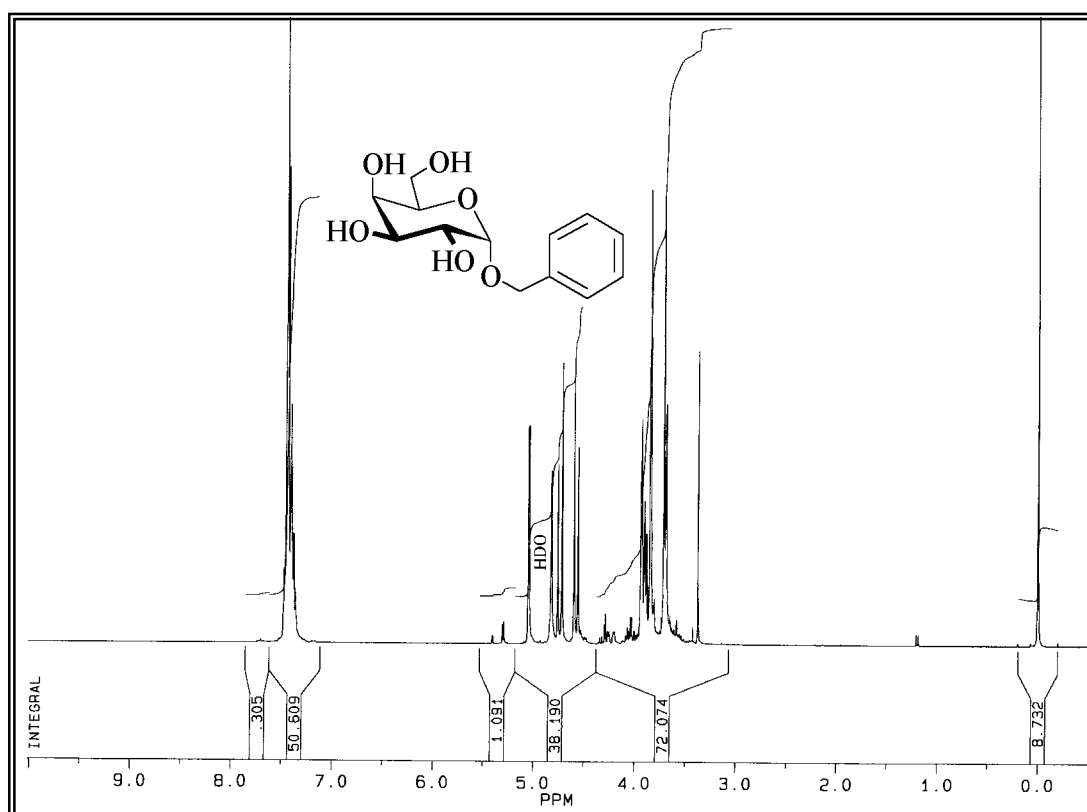
¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ = 5.04 (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 2.9$), 4.58 (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 7.9$)

$\alpha:\beta$ -Anomerenverhältnis: 4.9:2.1

Isolierte Ausbeute: 5.3g (71 %) als farbloser Feststoff

3.8.1. α -Benzyl-D-galactopyranosid (α -2c)*Partielle Hydrolyse von 2c mit β -Galactosidase nach AVV 6*

Ansatz:	5.2g (19.2 mmol)
β -Galactosidase:	1.392 U (348 mg)
Phosphat-Puffer:	165 ml, pH 4.5
Reaktionsdauer:	2d
Umkristallisation:	erst aus Ethanol und dann aus Aceton
Isolierte Ausbeute:	3.6g (69 %) als farbloser Feststoff
R_f -Wert:	0.28, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (17:3)

 **$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O):**

$\delta = 7.46\text{--}7.34$ (m, H_{Ar}), 5.04 (d, 1'-H), 4.73 (d, 1- H_a), 4.57 (d, 1- H_b), 3.93 (d, 4'-H), 3.90 (dd, 5'-H), 3.85-3.80 (m, 3'-H, 6'- H_a), 3.73-3.65 (m, 2'-H, 6'- H_b); $J_{1a, 1b} = 11.6$, $J_{1', 2'} = 2.9$, $J_{3', 4'} = 2.6$, $J_{5', 6a'} = J_{5', 6b'} = 6.1$ Hz.

 $^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, D_2O):

$\delta = 140.0$ (C_{Ar}), 131.6 (C_{Ar}), 131.4 (C_{Ar}), 131.2 (C_{Ar}), 100.7 (C-1'), 73.8 (C-5'), 72.5 (C-1), 72.4 (C-3'), 72.1 (C-4'), 71.2 (C-2'), 63.9 (C-6').

MS (ESI):

m/z (%) = 293 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_6$: 270.11.

3.9. α,β -Allyl-D-xylopyranosid (3a)*Acetalisierung von D-Xylose mit Allylkohol nach AAV 1*

Ansatz: 10g (67 mmol) Xyl, 30 ml Allylkohol

3h bei 80°C

Reinigung: Extraktion mit Ether

 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): $\delta = 4.93$ (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 3.6$), 4.44 (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 7.5$) $\alpha:\beta$ -Anomerenverhältnis: 2:1

Isolierte Ausbeute: 12.6g (99 %) als farbloser Feststoff

3.9.1. α -Allyl-D-xylopyranosid (α -3a)*Partielle Hydrolyse von 3a mit β -Galactosidase nach AVV 7*

Ansatz: 7g (36.8 mmol)

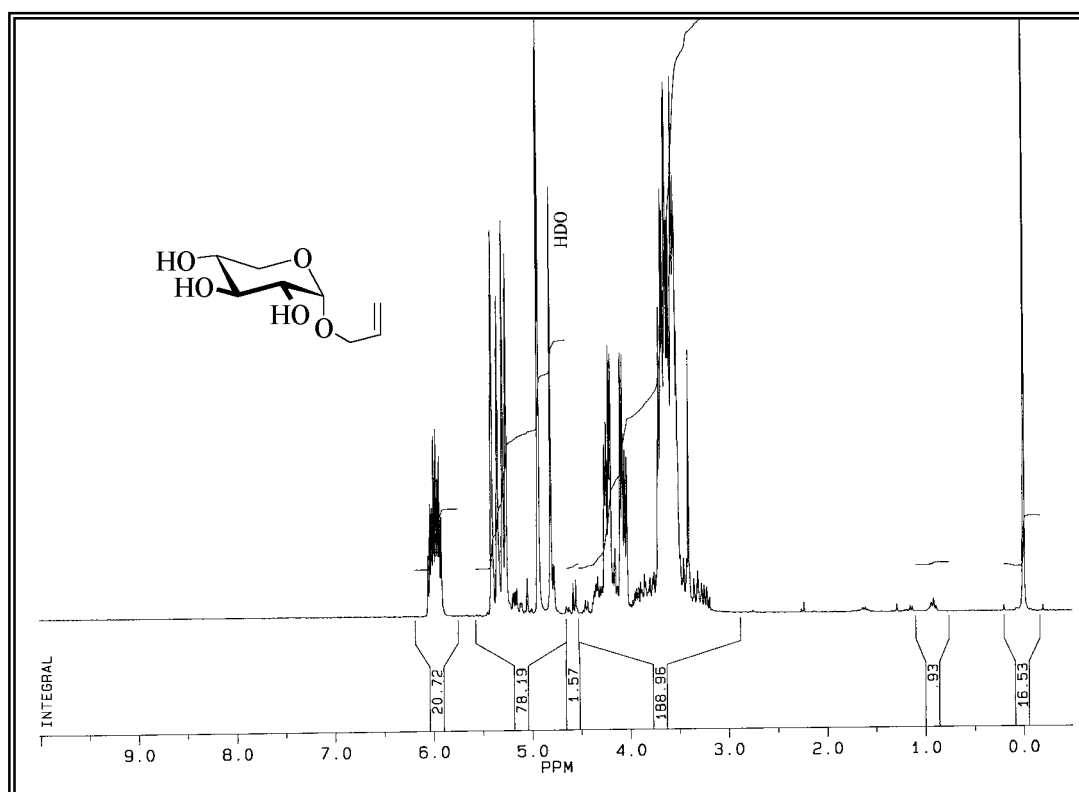
 β -Galactosidase (4 U/mg): 20.608 U (5.1 g)

Phosphat-Puffer: 315 ml, pH 4.5

Reaktionsdauer: 3d

Umkristallisation: erst aus Ethanol und dann aus Aceton

Isolierte Ausbeute: 4.6g (65 %) als farbloser Feststoff

 R_f -Wert: 0.4, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (17:3)

¹H-NMR (300 MHz, D₂O):

δ = 5.97 (dddd, 2-H), 5.38 (dd, 3-H_E), 5.27 (d, 3-H_Z), 4.93 (d, 1'-H), 4.23 (dd, 1-H_a), 4.06 (dd, 1-H_b), 3.71-3.52 (m, 5'-H_{ab}, 2'-H, 3'-H, 4'-H); $J_{1a, 1b}$ = 12.9, $J_{1a, 2}$ = 5.8, $J_{1b, 2}$ = 5.7, $J_{2, 3Z}$ = 10.4, $J_{2, 3E}$ = 16.9, $J_{3E, 3Z}$ = 1.4, $J_{1', 2'}$ = 3.5 Hz.

¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O):

δ = 136.4 (C-2), 121.2 (C-3), 100.3 (C-1'), 76.0 (C-2'), 74.1 (C-3'), 72.3 (C-4'), 71.5 (C-1), 64.1 (C-5').

MS (ESI):

m/z (%) = 212.6 (100) [M+Na]⁺.

C₈H₁₄O₅: 190.08.

3.10. α,β -Pent-4-enyl-D-xylopyranosid (3b)

Acetalisierung von D-Xylose mit 4-Pentenol nach AAV 2

Ansatz: 1g (6.7 mmol) Xyl, 7.3 ml 4-Pentenol

2h bei 90°C

¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ = 4.87 (d, 1'-H; $J_{1', 2'}$ = 3.6), 4.38 (d, 1'-H; $J_{1', 2'}$ = 7.9)

$\alpha:\beta$ -Anomerenverhältnis: 2:1

Isolierte Ausbeute: 1.4g (98 %) als farbloser Feststoff

3.10.1. α -Pent-4-enyl-D-xylopyranosid (α -3b)

Partielle Hydrolyse von 3b mit β -Galactosidase nach AVV 7

Ansatz: 1.2g (5.7 mmol)

β -Galactosidase (4 U/mg): 3.200 U (0.8 g)

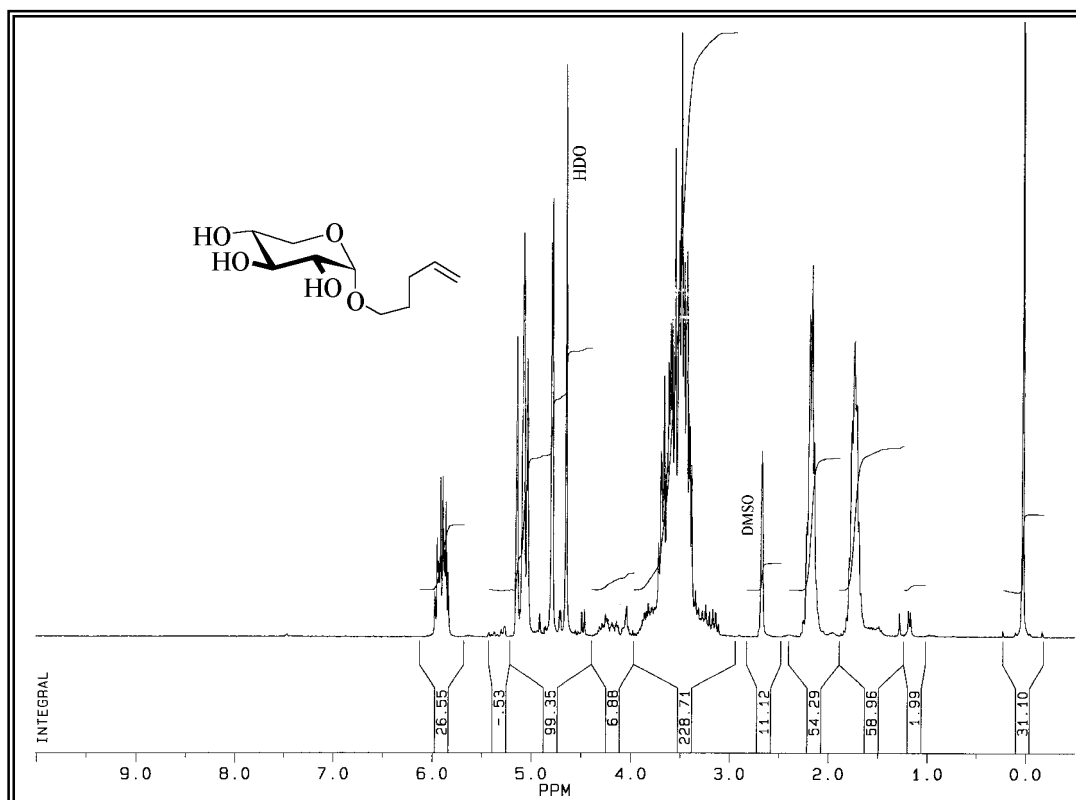
Phosphat-Puffer: 50 ml, pH 4.5

3d

Umkristallisation: aus Aceton

Isolierte Ausbeute: 0.8g (65 %) als farbloser Feststoff

R_f -Wert: 0.45, CH₂Cl₂/MeOH (17:3)

**¹H-NMR (300 MHz, D₂O/DMSO):**

δ = 5.91 (dddd, 4-H), 5.09 (m, 5-H_{EZ}), 4.79 (d, 1'-H), 3.72-3.39 (m, 5'-H_{ab}, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 1-H_{ab}), 2.17 (m, 3-H_{ab}), 1.73 (m, 2-H_{ab}); $J_{3a,4} = J_{3b,4} = 6.5$, $J_{4,5Z} = 10.3$, $J_{4,5E} = 17.0$, $J_{1',2'} = 3.5$ Hz.

¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O/DMSO):

δ = 141.8 (C-4), 118.5 (C-5), 101.7 (C-1'), 76.4 (C-2'), 74.7 (C-3'), 72.7 (C-4'), 70.5 (C-1), 64.5 (C-5'), 33.0 (C-3), 31.2 (C-2).

MS (ESI):

m/z (%) = 240.7 (100) [M+Na]⁺.

C₁₀H₁₈O₅: 218.12.

3.11. α,β -Benzyl-D-xylopyranosid (3c)

Acetalisierung von D-Xylose mit Benzylalkohol nach AAV 2

Ansatz: 10g (67 mmol) Xyl, 100 ml Benzylalkohol

20h bei 80°C

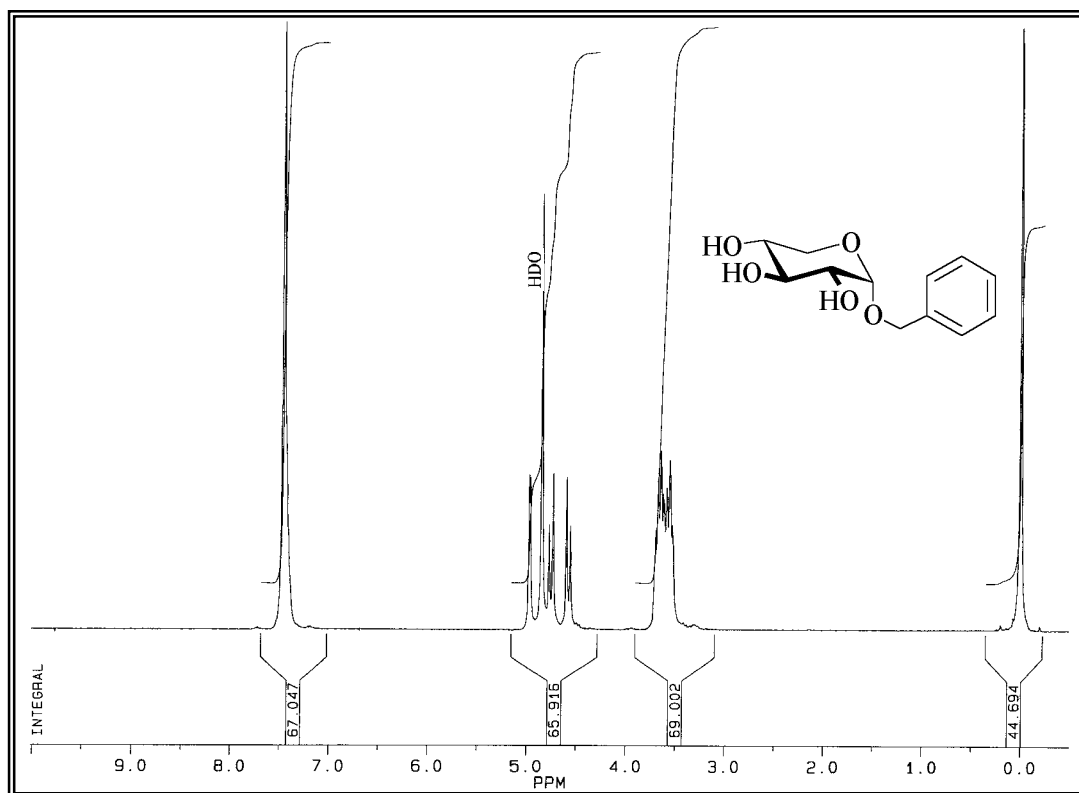
¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ = 4.93 (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 3.7$), 4.44 (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 7.7$)

$\alpha:\beta$ -Anomerenverhältnis: 2:1

Isolierte Ausbeute: 13g (81 %) als farbloser Feststoff

3.11.1. α -Benzyl-D-xylopyranosid (α -3c)*Partielle Hydrolyse von 3c mit β -Galactosidase nach AVV 7*

Ansatz:	7.6g (31.8 mmol)
β -Galactosidase (4 U/mg):	17.800 U (4.45 g)
Phosphat-Puffer:	272 ml, pH 4.5
Reaktionsdauer:	3d
Umkristallisation:	aus Aceton
Isolierte Ausbeute:	4.6g (61 %) als farbloser Feststoff
R_f -Wert:	0.45, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (17:3)

 **$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O):**

$\delta = 7.45\text{--}7.18$ (m, H_{Ar}), 4.97 (d, $1'\text{-H}$), 4.75 (d, 1-H_a), 4.57 (d, 1-H_b), 3.70–3.53 (m, $5'\text{-H}_{ab}$, $2'\text{-H}$, $3'\text{-H}$, $4'\text{-H}$); $J_{1a, 1b} = 11.7$, $J_{1', 2'} = 3.4$ Hz.

 $^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, D_2O):

$\delta = 139.7$ (C_{Ar}), 131.5 (C_{Ar}), 131.3 (C_{Ar}), 131.1 (C_{Ar}), 100.4 ($\text{C-1}'$), 76.0 ($\text{C-2}'$), 74.1 ($\text{C-3}'$), 72.4 ($\text{C-4}'$), 72.2 (C-1), 64.1 ($\text{C-5}'$).

MS (ESI):

m/z (%) = 262.8 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_5$: 240.10.

3.12. α,β -Allyl-L-arabinopyranosid (4a)*Acetalisierung von L-Arabinose mit Allylkohol nach AAV 1*

Ansatz: 1g (6.7 mmol) Ara, 14.4 ml Allylkohol

1h bei 90°C

Reinigung: Extraktion mit Ether

 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): $\delta = 4.98$ (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 2.9$), 3.38 (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 7.6$) $\alpha:\beta$ -Anomerenverhältnis: 1.5:3.2

Isolierte Ausbeute: 0.9g (69 %) als farbloser Feststoff

3.12.1. β -Allyl-L-arabinopyranosid (β -4a)*Partielle Hydrolyse von 4a mit β -Galactosidase nach AVV 7*

Ansatz: 1.1g (5.8 mmol)

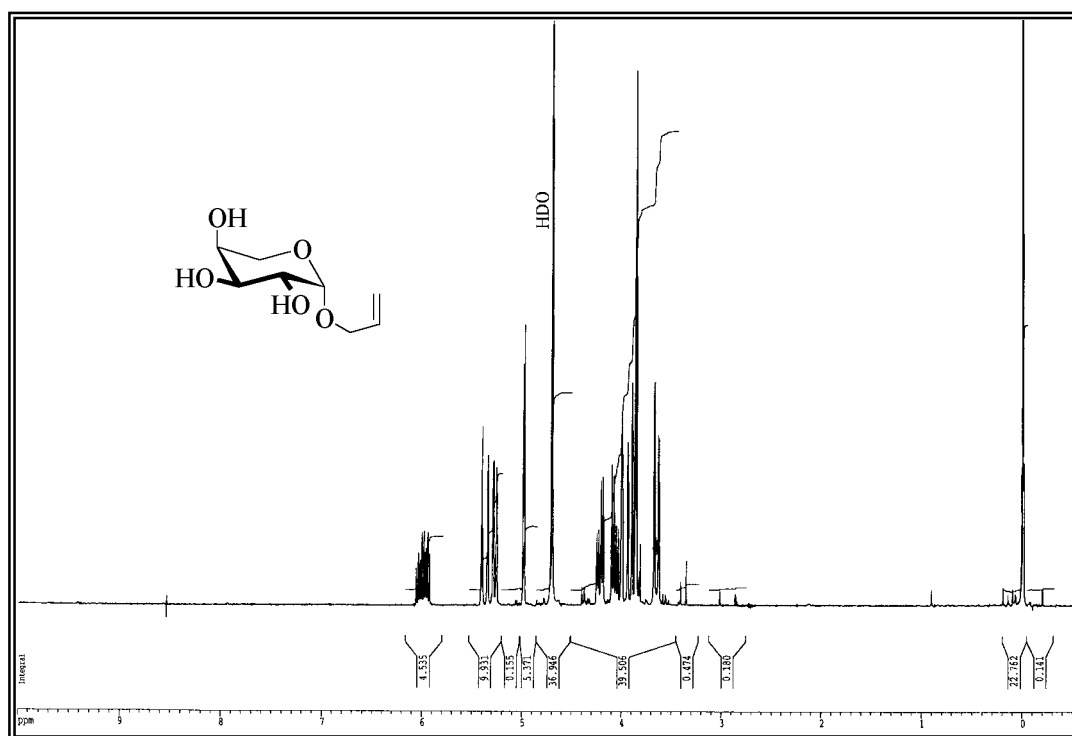
 β -Galactosidase (4 U/mg): 3.500 U (0.9 g)

Phosphat-Puffer: 164 ml, pH 4.5

3d

Umkristallisation: erst aus Aceton und dann aus CH_2Cl_2

Isolierte Ausbeute: 0.5g (46 %) als farbloser Feststoff

 R_f -Wert: 0.37, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (17:3)

¹H-NMR (300 MHz, D₂O):

δ = 5.99 (dddd, 2-H), 5.38 (ddd, 3-H_E), 5.28 (ddd, 3-H_Z), 4.99 (d, 1'-H), 4.22 (dddd, 1-H_a), 4.07 (dddd, 1-H_b), 4.0 (dd, 4'-H), 3.92 (dd, 5'-H_a), 3.87-3.85 (m, 2'-H, 3'-H), 3.65 (dd, 5'-H_b); $J_{1a, 1b}$ = 12.9, $J_{1a, 2}$ = 5.5, $J_{1a, 3E}$ = 1.3, $J_{1a, 3Z}$ = 1.1, $J_{1b, 2}$ = 6.3, $J_{1b, 3E}$ = $J_{1b, 3Z}$ = 1.1, $J_{2, 3Z}$ = 10.8, $J_{2, 3E}$ = 17.0, $J_{1', 2'}$ = 3.0, $J_{3', 4'}$ = 3.9, $J_{4', 5a'}$ = 1.1, $J_{4', 5b'}$ = 2.1, $J_{5a', 5b'}$ = 12.7 Hz.

¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O):

δ = 136.5 (C-2), 121.0 (C-3), 100.8 (C-1'), 71.8 (C-4'), 71.7 (C-2'), 71.6 (C-1), 71.0 (C-3'), 65.6 (C-5').

MS (ESI):

m/z (%) = 213.2 (100) [M+Na]⁺.

C₈H₁₄O₅: 190.08.

3.13. α,β -Pent-4-enyl-L-arabinopyranosid (4b)

Acetalisierung von L-Arabinose mit 4-Pentenol nach AAV 2

Ansatz: 1g (6.7 mmol) Ara, 7.2 ml 4-Pentenol

1h bei 90°C

¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ = 4.97 (d, 1'-H; $J_{1', 2'}$ = 3.6), 3.37 (d, 1'-H; $J_{1', 2'}$ = 7.7)

$\alpha:\beta$ -Anomerenverhältnis: 1.8:3.1

Isolierte Ausbeute: 1g (71 %) als farbloser Feststoff

3.13.1. β -Pent-4-enyl-L-arabinopyranosid (β -4b)

Partielle Hydrolyse von 4b mit β -Galactosidase nach AVV 7

Ansatz: 1.4g (6.2 mmol)

β -Galactosidase (4 U/mg): 3.770 U (0.94 g)

Phosphat-Puffer: 177 ml, pH 4.5

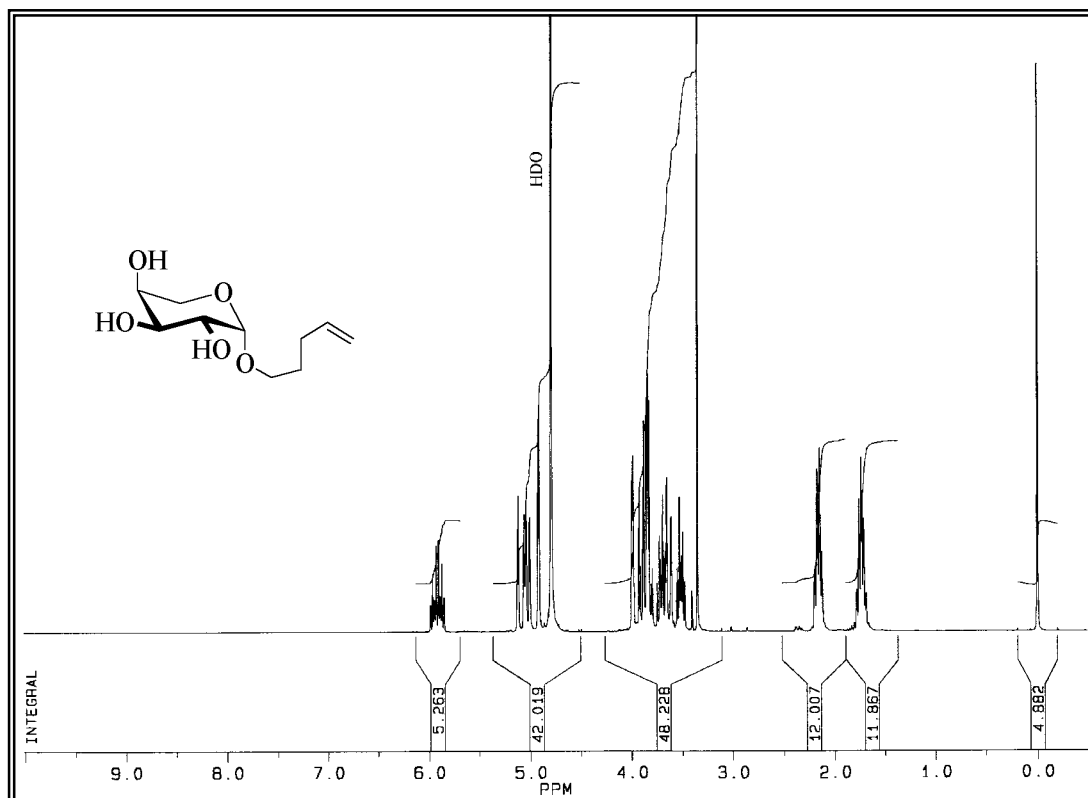
3d

RP-Kieselgel (H₂O und dann Ethanol)

Kristallisation aus CH₂Cl₂

Isolierte Ausbeute: 0.6g (45%) als farbloser Feststoff

R_F-Wert: 0.41, CH₂Cl₂/MeOH (17:3)

**¹H-NMR (300 MHz, D₂O):**

δ = 5.91 (dddd, 4-H), 5.09 (m, 5-H_E), 5.02 (m, 5-H_Z), 4.91 (d, 1'-H), 3.98 (m, 4'-H), 3.90 (d, 5'-H_a), 3.84 (dd, 2'-H), 3.82 (m, 3'-H), 3.70 (m, 1-H_a), 3.63 (dd, 5'-H_b), 3.51 (m, 1-H_b), 2.15 (m, 3-H_{ab}), 1.73 (m, 2-H_{ab}); $J_{3a,4} = J_{3b,4} = 6.6$, $J_{4,5Z} = 10.4$, $J_{4,5E} = 17.1$, $J_{1',2'} = 3.1$, $J_{2',3'} = 5.5$, $J_{4',5a'} = 2.0$, $J_{5a',5b'} = 12.6$ Hz.

¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O):

δ = 141.7 (C-4), 117.5 (C-5), 101.5 (C-1'), 71.7 (C-4'), 71.6 (C-2'), 71.1 (C-3'), 70.5 (C-1), 65.5 (C-5'), 32.5 (C-3), 30.6 (C-2).

MS (ESI):

m/z (%) = 241.2 (100) [M+Na]⁺.

C₁₀H₁₈O₅: 218.12.

3.14. α,β -Benzyl-L-arabinopyranosid (4c)

Acetalisierung von L-Arabinose mit Benzylalkohol nach AAV 2

Ansatz: 1g (6.7 mmol) Ara, 14.4 ml Benzylalkohol

1h bei 90°C

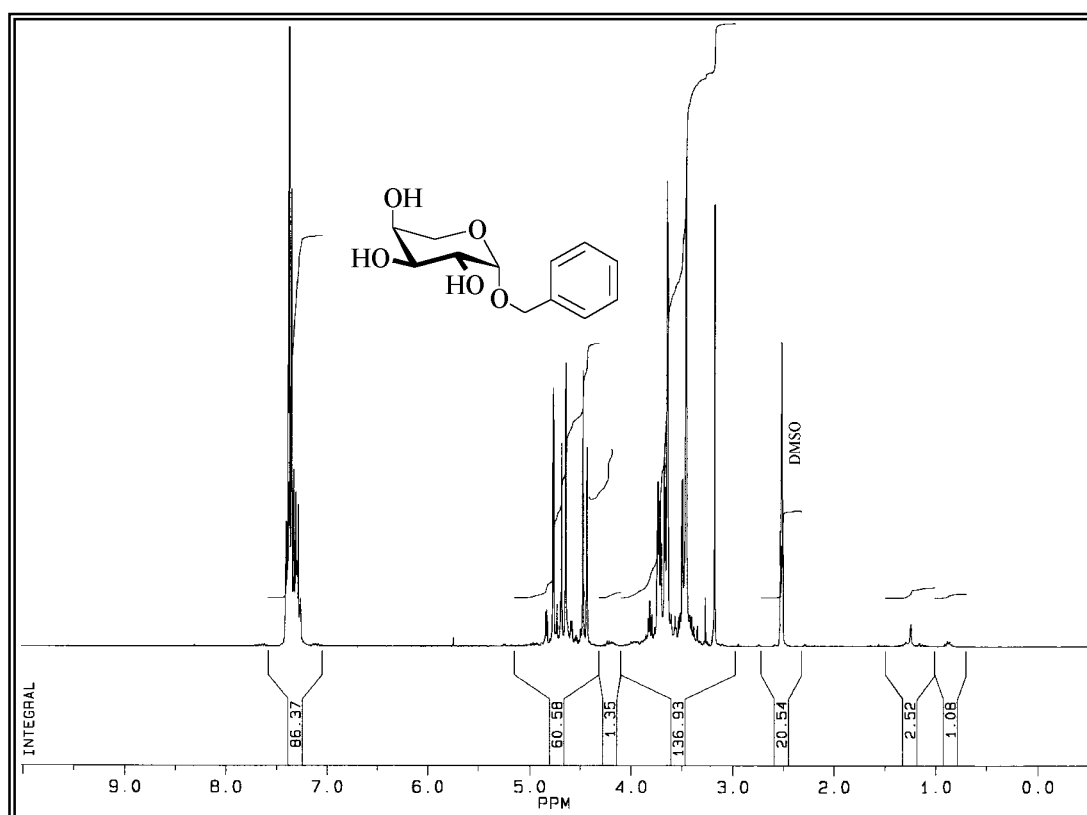
¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ = 4.98 (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 3.6$), 3.39 (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 7.7$)

$\alpha:\beta$ -Anomerenverhältnis: 1.8:3.1

Isolierte Ausbeute: 1.1g (71 %) als farbloser Feststoff

3.14.1. β -Benzyl-L-arabinopyranosid (β -4c)*Partielle Hydrolyse von 4c mit β -Galactosidase nach AVV 7*

Ansatz: 0.7g (3.0 mmol)
 β -Galactosidase (4 U/mg): 1.870 U (0.47 g)
 Phosphat-Puffer: 87 ml, pH 4.5
 3d
 RP-Kieselgel (H₂O und dann Ethanol)
 Kristallisation aus CH₂Cl₂
 Isolierte Ausbeute: 0.3g mg (45%) als farbloser Feststoff
 R_f -Wert: 0.41, CH₂Cl₂/MeOH (17:3)

**¹H-NMR (300 MHz, DMSO):**

δ = 7.40-7.25 (m, H_{Ar}), 4.76 (d, 1'-H), 4.66 (d, 1-H_a), 4.45 (d, 1-H_b), 3.72 (m, 4'-H), 3.68 (dd, 5'-H_a), 3.64-3.60 (m, 2'-H, 3'-H), 3.47 (dd, 5'-H_b); $J_{1a, 1b}$ = 12.3, $J_{1', 2'}$ = 1.4, $J_{4', 5a'}$ = 1.8, $J_{4', 5b'}$ = 2.8, $J_{5a', 5b'}$ = 11.9 Hz.

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO):

δ = 138.1 (C_{Ar}), 128.1 (C_{Ar}), 127.4 (C_{Ar}), 127.3 (C_{Ar}), 98.8 (C-1'), 68.8 (C-4'), 68.4 (C-2'), 68.3 (C-1), 68.1 (C-3'), 63.2 (C-5').

MS (ESI):

m/z (%) = 263.2 (100) [M+Na]⁺.
 C₁₂H₁₆O₅: 240.10.

3.15. Allyl-2-acetamido-2-desoxy- α,β -D-glucopyranosid (5a)*Acetalisierung von N-Acetyl-D-glucosamin mit Allylkohol*

In einem Rundkolben gibt man 43 ml Allylkohol, 10g N-Acetyl-D-glucosamin (45 mmol) und 1.2 ml BF_3 -Etherat (9 mmol) zu. Die Reaktion wird unter Rühren auf 100°C erhitzt und nach 2h abgebrochen. Überschüssige Allylkohol wird im Vakuum eingengt und der Rückstand durch Extraktion mit Diethylether gereinigt. Die wässrige Lösung wird im Vakuum eingengt und das Anomerenverhältnis durch ^1H -NMR-Spektroskopie bestimmt.

^1H -NMR (300 MHz, D_2O): $\delta = 4.92$ (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 3.3$), 4.56 (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 8.5$)

$\alpha:\beta$ -Anomerenverhältnis: 4.3:2.7

Isolierte Ausbeute: 11.8g (99 %) als farbloser Feststoff

3.15. Allyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (α -5a)*Partielle Hydrolyse von 5a mit β -Galactosidase nach AVV 7*

Ansatz: 10g (38.3 mmol)

β -Galactosidase: 20.000 U (5 g)

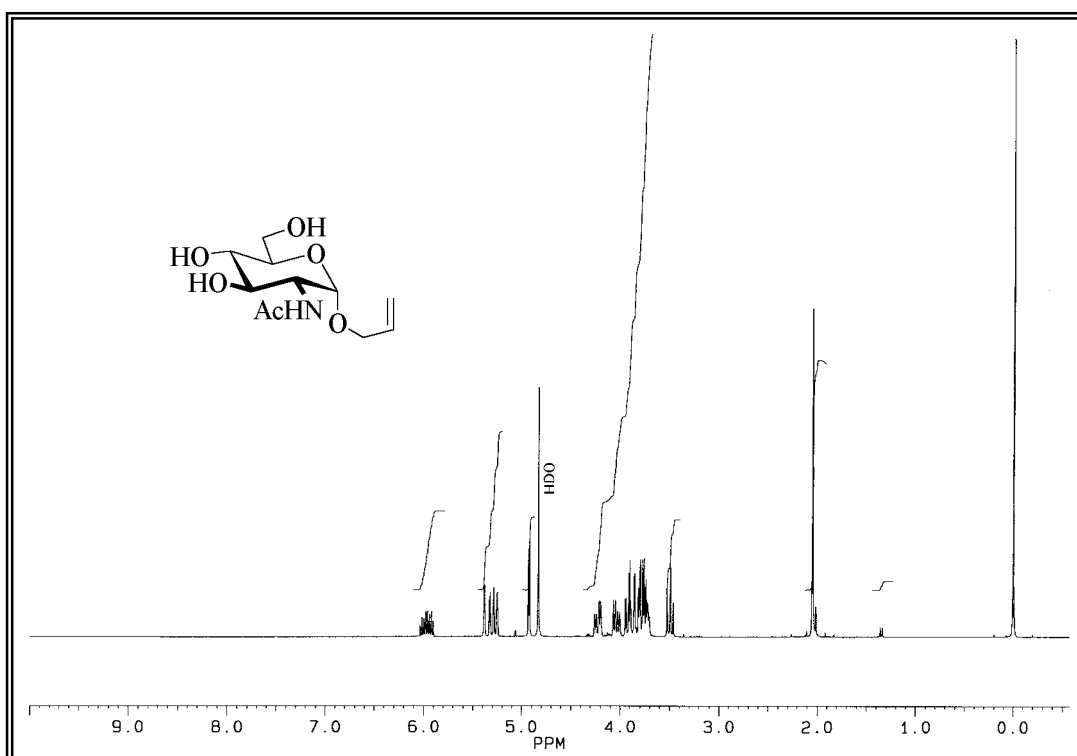
Phosphat-Puffer: 450 ml, pH 4.5

4d

Umkristallisation: erst aus Ethanol und dann aus Aceton

Isolierte Ausbeute: 6g (60 %) als farbloser Feststoff

R_f -Wert: 0.34, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (17:3)



¹H-NMR (300 MHz, D₂O):

δ = 5.90 (dddd, 2-H), 5.35 (dddd, 3-H_E), 5.26 (dd, 3-H_Z), 4.92 (d, 1'-H), 4.22 (dddd, 1-H_a), 4.03 (dddd, 1-H_b), 3.93 (dd, 2'-H), 3.87 (dd, 6'-H_a), 3.83-3.70 (m, 6'-H_b, 3'-H, 5'-H), 3.50 (dd, 4'-H), 2.05 (s, CH₃); $J_{1a, 1b} = 13.2$, $J_{1a, 2} = 5.2$, $J_{1a, 3E} = 1.3$, $J_{1a, 3Z} = 1.4$, $J_{1b, 2} = 6.0$, $J_{1b, 3E} = J_{1b, 3Z} = 1.3$, $J_{2, 3Z} = 10.4$, $J_{2, 3E} = 17.2$, $J_{3E, 3Z} = 1.6$, $J_{1', 2'} = 3.6$, $J_{2', 3'} = 10.7$, $J_{3', 4'} = 9.4$, $J_{4', 5'} = 9.2$, $J_{5', 6a'} = 1.8$, $J_{6a', 6b'} = 12.0$ Hz.

¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O):

δ = 177.3 (C=O), 136.5 (C-2), 120.7 (C-3), 98.9 (C-1'), 74.8 (C-5'), 73.8 (C-3'), 72.8 (C-4'), 71.3 (C-1), 63.3 (C-6'), 56.5 (C-2'), 24.7 (CH₃).

MS (FD):

m/z (%): 261 (100) [M]⁺.

C₁₁H₁₉NO₆: 261.12.

3.16. Pent-4-enyl-2-acetamido-2-desoxy- α , β -D-glucopyranosid (α -5b)

Acetalisierung von N-Acetyl-D-glucosamin mit 4-Propanol nach AAV 3

Ansatz: 1g (4.5 mmol) GlcNAc, 5 ml 4-Pentenol

¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ = 4.86 (d, 1'-H; $J_{1', 2'} = 3.5$), 4.50 (d, 1'-H; $J_{1', 2'} = 8.4$)

α/β -Anomerenverhältnis: 6:1

Isolierte Ausbeute: 1.3g (99 %) als farbloser Feststoff

3.16.1. Pent-4-enyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (α -5b)

Partielle Hydrolyse von 5b mit β -Galactosidase nach AVV 7

Ansatz: 1.2g (4.1 mmol)

β -Galactosidase: 2.290 U (0.5 g)

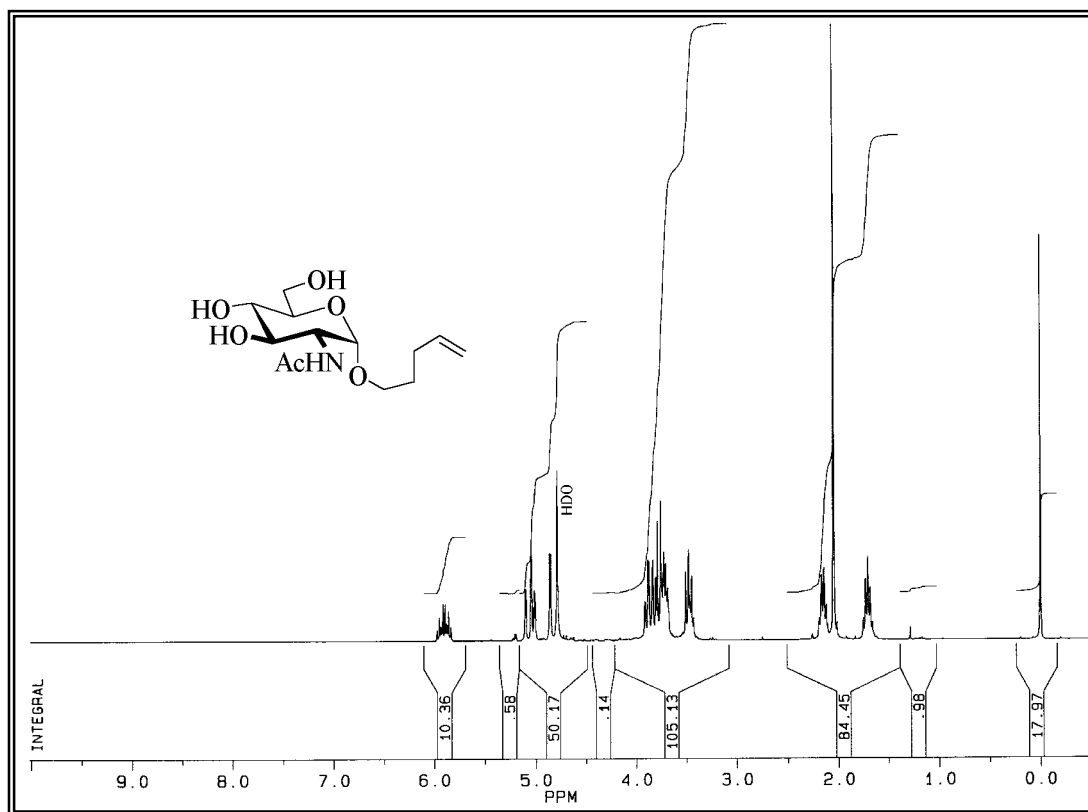
Phosphat-Puffer: 30 ml, pH 4.5

2d

Umkristallisation: erst aus Aceton und dann aus CH₂Cl₂/Ether

Isolierte Ausbeute: 0.9g (76 %) als farbloser Feststoff

R_F -Wert: 0.46, CH₂Cl₂/MeOH (17:3)

**¹H-NMR (300 MHz, D₂O):**

δ = 5.89 (dddd, 4-H), 5.04 (m, 5-H_{EZ}), 4.85 (d, 1'-H), 3.83 (dd, 2'-H), 3.78-3.68 (m, 3'-H, 6'-H_{ab}, 5'-H, 1-H_{ab}), 3.48 (dd, 4'-H), 2.14 (m, 3-H_{ab}), 2.0 (s, CH₃), 1.70 (m, 2-H_{ab}); $J_{3a,4} = J_{3b,4} = 6.6$, $J_{4,5Z} = 10.3$, $J_{4,5E} = 17.1$, $J_{1',2'} = 3.5$, $J_{2',3'} = 10.6$, $J_{3',4'} = J_{4',5'} = 8.8$ Hz.

¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O):

δ = 177.0 (C=O), 141.7 (C-4), 117.6 (C-5), 99.5 (C-1'), 74.5 (C-5'), 73.7 (C-3'), 72.8 (C-4'), 70.1 (C-1), 63.3 (C-6'), 56.6 (C-2'), 32.4 (C-3), 30.5 (C-2), 24.7 (CH₃).

MS (ESI):

m/z (%) = 311.9 (100) [M+Na]⁺.

C₁₃H₂₃NO₆: 289.15.

3.17. Benzyl-2-acetamido-2-desoxy- α,β -D-glucopyranosid (5c)

Acetalisierung von N-Acetyl-D-glucosamin mit Benzylalkohol nach AAV 3

Ansatz: 6g (27 mmol) GlcNAc, 48 ml Benzylalkohol

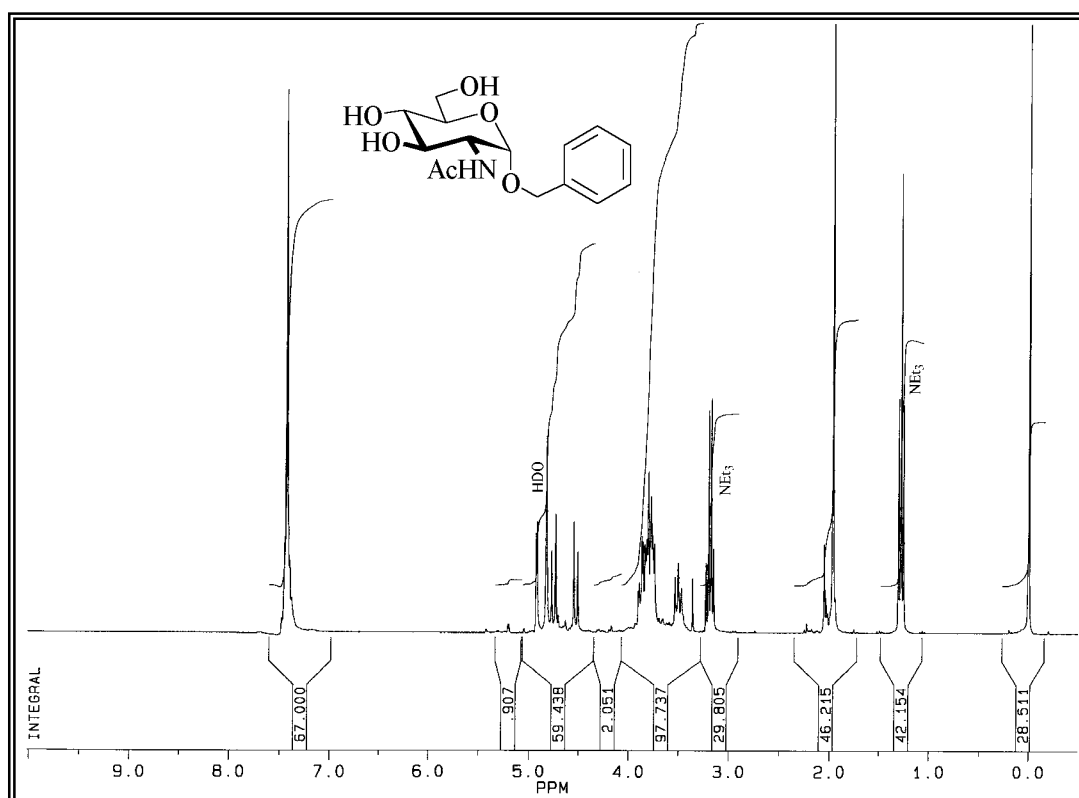
¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ = 4.92 (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 3.5$), 4.55 (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 8.0$)

α/β -Anomerenverhältnis: 2:1

Isolierte Ausbeute: 7.7g (92 %) als farbloser Feststoff

3.17.1. Benzyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (α -5c)*Partielle Hydrolyse von 5c mit β -Galactosidase nach AVV 7*

Ansatz:	7.6g (24.5 mmol)
β -Galactosidase:	13.730 U (3.4 g)
Phosphat-Puffer:	210 ml, pH 4.5
	3d
Umkristallisation:	erst aus Ethanol und dann aus Aceton
Isolierte Ausbeute:	4.8g (64 %) als farbloser Feststoff
R_F -Wert:	0.51, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (17:3)

 **^1H -NMR (300 MHz, D_2O):**

δ = 7.44 (m, H_{Ar}), 4.92 (d, 1'-H), 4.75 (d, 1- H_a), 4.53 (d, 1- H_b), 3.93-3.74 (m, 2'-H, 3'-H, 6'- H_{ab} , 5'-H), 3.53 (t, 4'-H), 1.96 (s, CH_3); $J_{1a, 1b} = 11.9$, $J_{1', 2'} = 3.4$, $J_{3', 4'} = J_{4', 5'} = 9.2$ Hz.

 ^{13}C -NMR (75.4 MHz, D_2O):

δ = 177.1 ($\text{C}=\text{O}$), 139.8 (C_{Ar}), 131.6 (C_{Ar}), 131.3 (C_{Ar}), 131.2 (C_{Ar}), 98.7 (C-1'), 74.9 (C-5'), 73.7 (C-3'), 72.8 (C-4'), 72.4 (C-1), 63.3 (C-6'), 56.5 (C-2'), 24.6 (CH_3).

MS (ESI):

m/z (%) = 334.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_6$: 311.14.

3.18. α,β -Allyl-D-Arabinopyranosid (6a)*Acetalisierung von D-Arabinose mit Allylalkohol nach AAV 1*

Ansatz:	0.5g (3.3 mmol) Ara, 7.2 ml Allylalkohol 1h bei 90°C
Reinigung:	Extraktion mit Ether
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O):	$\delta = 4.97$ (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 3.2$), 3.39 (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 7.8$)
α/β -Anomerenverhältnis:	3:1
Isolierte Ausbeute:	0.4g (70 %) als farbloser Feststoff

3.19. α,β -Allyl-L-Fucopyranosid (7a)*Acetalisierung von L-Fucose mit Allylalkohol nach AAV 1*

Ansatz:	0.5g (3.0 mmol) Fuc, 6.6 ml Allylalkohol 1h bei 90°C
Reinigung:	Extraktion mit Ether
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O):	$\delta = 4.93$ (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 3.8$), 4.42 (d, 1'-H; $J_{1',2'} = 7.8$)
Anomerenverhältnis α/β :	2:1
Isolierte Ausbeute:	0.5g (80 %) als farbloser Feststoff

3.20. Ethyl- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosid (8)*Acetalisierung nach AAV 1 (S. 97, 3.4.)**Unerwartete Transglycosylierung von 1d mit β -Galactosidase nach AAV 7*

Ansatz:	0.5g (2.4 mmol) α , β -Ethyl-D-glucosid (1d)
β -Galactosidase:	1.345 U (134 mg)
Phosphat-Puffer:	10 ml, pH 4.5 1d bei RT
Kieselgur/Aktivkohle	Wasser und dann EtOH/ H_2O (2:98 \rightarrow 20:80)
Isolierte Ausbeute:	Kristallisation aus Aceton 100 mg (11 %)

3.20.1. 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-1-*O*-ethyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosid

Peracetylierung von 8 nach AAV 9

100 mg (0.27 mmol)

4 ml Acetanhydrid

Umkristallisation:

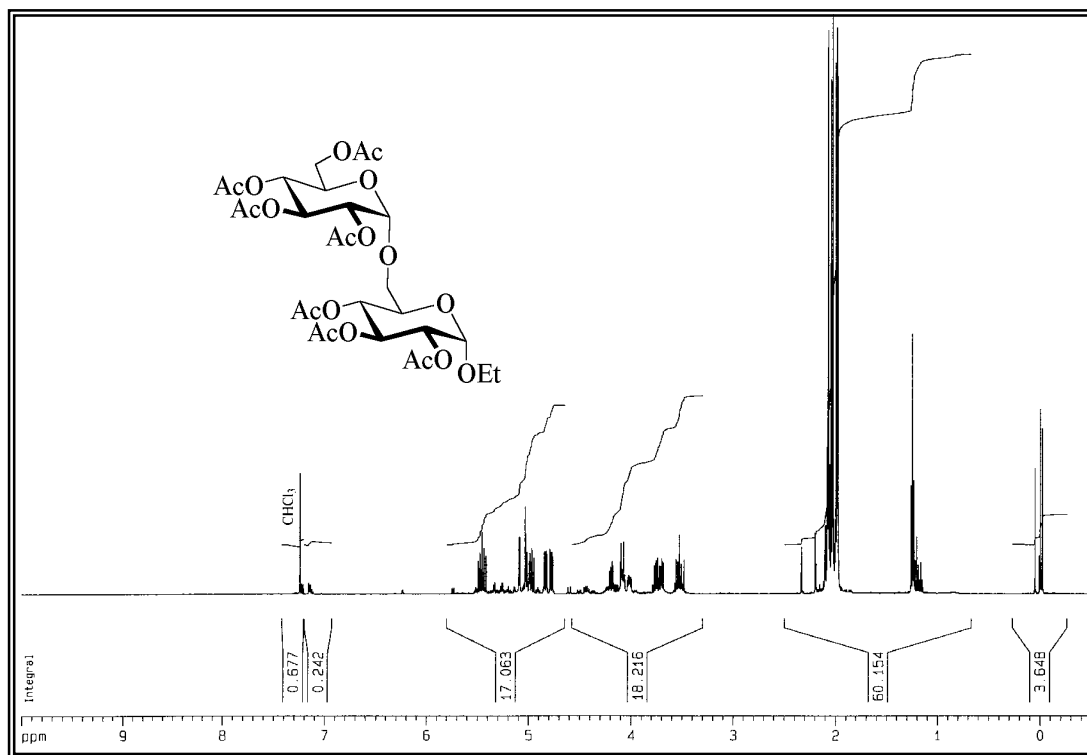
aus Diethylether/Petrolether

Isolierte Ausbeute:

173 mg (97%)

R_f -Wert:

0.52, Chloroform/MeOH (40:1)



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3):

δ = 5.49 (dd, 3'-H), 5.46 (dd, 3''-H), 5.11 (d, 1''-H), 5.05 (d, 1'-H), 5.03 (dd, 4''-H), 4.99 (dd, 4'-H), 4.85 (dd, 2''-H), 4.80 (dd, 2'-H), 4.21 (dd, 1-H_a), 4.12-4.08 (m, 1-H_b, 5''-H), 4.03 (ddd, 5'-H), 3.78 (dd, 6''-H_a), 3.72 (dd, 6'-H_a), 3.56 (dd, 6''-H_b), 3.52 (dd, 6'-H_b); $J_{1a, 1b}$ = 12.3, $J_{1a, 2a}$ = 4.8, $J_{1', 2'}$ = 3.7, $J_{2', 3'}$ = 10.2, $J_{3', 4'}$ 9.3, = $J_{4', 5'}$ = 10.3, $J_{5', 6a'}$ = 6.0, $J_{5', 6b'}$ = 2.5, $J_{6a', 6b'}$ = 11.0, $J_{1'', 2''}$ = 3.7, $J_{2'', 3''}$ = 10.2, $J_{3'', 4''}$ 9.3, = $J_{4'', 5''}$ = 10.0, $J_{5'', 6a''}$ = $J_{5'', 6b''}$ = 7.0, $J_{6a'', 6b''}$ = 10.0 Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CDCl_3):

δ = 172.2 (C=O), 97.7 (C-1''), 97.2 (C-1'), 73.1 (C-2'), 72.8 (C-2''), 72.4 (C-3'), 72.1 (C-3''), 71.6 (C-4'), 70.7 (C-4''), 70.2 (C-5'), 69.5 (C-5''), 68.5 (C-6'), 66.1 (C-6''), 64.0 (C-1), 22.6 (CH_3), 16.9 (C-2).

MS (ESI):

m/z (%) = 687.21 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

$\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_{18}$: 664.22.

3.21. 2,4-Dinitrophenyl- β -D-glucopyranosid (β -9)*Arylierug von β -D-Glucose mit 2,4-Dinitrofluorbenzol (DNFB) nach AAV 8*

Ansatz: 1g (5.5 mmol)
 1.3 g DNFB (7.2 mmol)
 20 ml DMF und 1.3g 15-Crown-5-Ether (6.1 mmol)
 0.24 g NaH (6.1 mmol)

Reaktionsdauer: 2.5h

Chromatographie an Kieselgel: Toluol und dann Toluol/MeOH (12:1, 6:1 und 3:1)
 Kristallisation aus Aceton

Isolierte Ausbeute: 1g (53 %) als gelblicher Feststoff

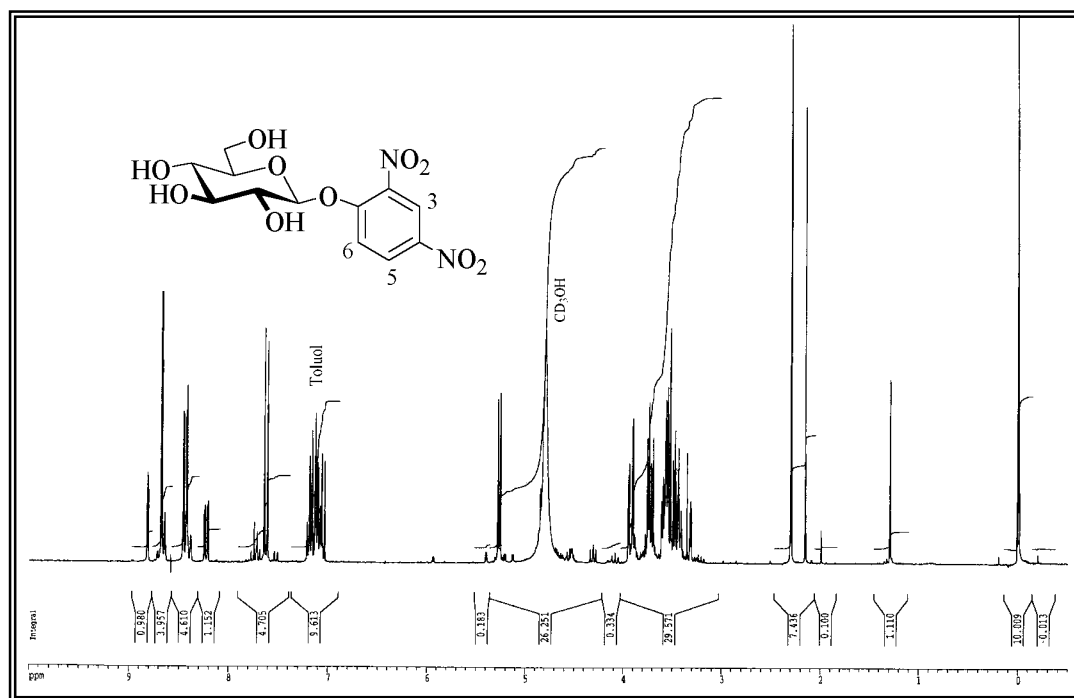
R_f -Wert: 0.22, Toluol/MeOH (4:1)

Arylierug von β -D-Glucose mit DNFB nach AAV 8

Ansatz: 100 mg (0.5 mmol)
 103 mg DNFB (0.5 mmol)
 2 ml DMF und 55 mg DME (0.6 mmol)
 24 mg NaH (0.6 mmol)

Reaktionsdauer: 4h

Isolierte Ausbeute: 100 mg (52 %)

 **^1H -NMR (300 MHz, MeOD):**

δ = 8.65 (d, 3-H), 8.45 (dd, 5-H), 7.63 (d, 6-H), 5.27 (d, 1'-H), 3.93 (dd, 6'-H_a), 3.73 (dd, 6'-H_b), 3.61-3.41 (m, 3'-H, 5'-H, 2'-H, 4'-H); $J_{3,5} = 2.7$, $J_{5,6} = 9.3$, $J_{1',2'} = 7.3$, $J_{5',6a'} = 2.2$, $J_{5',6b'} = 5.7$, $J_{6a',6b'} = 12.1$ Hz.

 ^{13}C -NMR (75.4 MHz, MeOD):

δ = 129.9 (C-5), 122.1 (C-3), 119.0 (C-6), 102.2 (C-1'), 78.6 (C-3'), 77.9 (C-5'), 74.5 (C-2'), 70.9 (C-4'), 62.4 (C-6').

MS (ESI):

m/z (%) = 369.05 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_{10}$: 346.06.

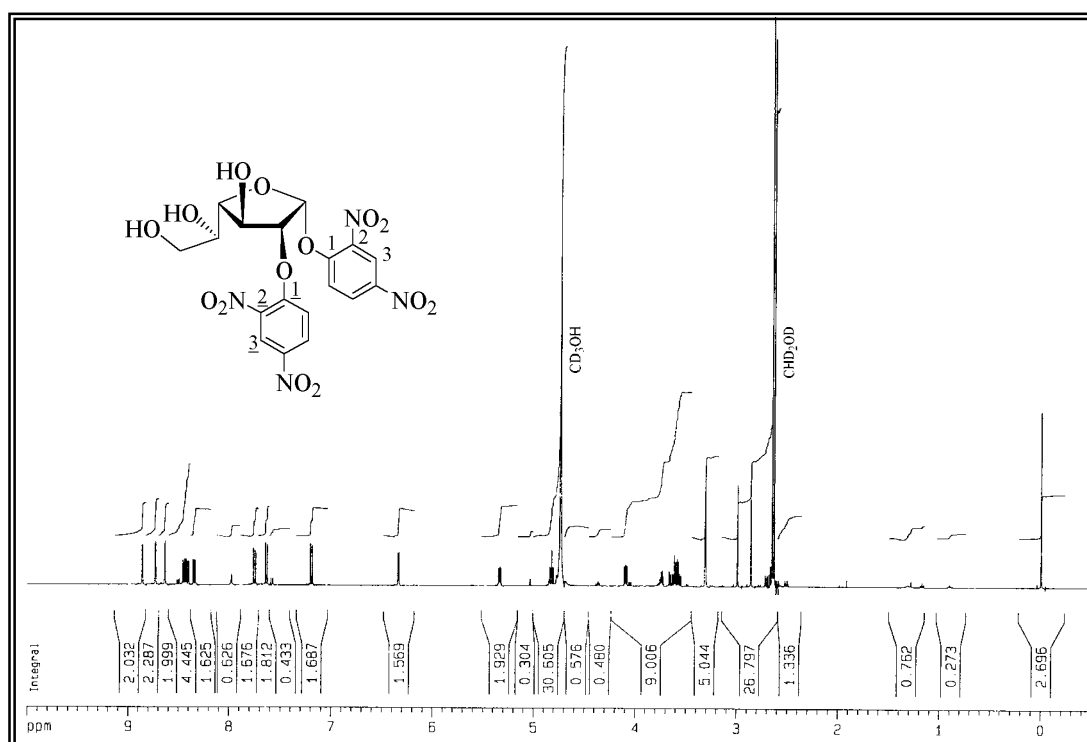
3.22. 2,4-Dinitrophenyl-2-O-2,4-dinitrophenyl- α -D-galactofuranosid (α -10)*Arylierung von D-Galactose mit DNFB nach AAV 8*

Ansatz: 100 mg (0.5 mmol)
 103 mg DNFB (0.5 mmol)
 2 ml DMF, 55 mg DME (0.6 mmol) und 1 ml HMPA
 24 mg NaH (0.6 mmol)

Reaktionsdauer: 20h

Chromatographie an Kieselgel: Toluol und dann Toluol/MeOH (12:0.1, 12:1, 6:1 und 3:1)

Isolierte Ausbeute: 70 mg (25 %) als gelblicher Feststoff

 **$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz; CD_3OD):**

δ = 8.72 (d, 3-H), 8.63 (d, 3-H), 8.44 (dd, 5-H), 8.42 (dd, 5-H), 7.75 (d, 6-H), 7.63 (d, 6-H), 6.33 (d, 1'-H), 5.33 (dd, 2'-H), 4.82 (t, 3'-H), 4.09 (dd, 4'-H), 3.74 (m, 5'-H), 3.66-3.55 (m, 6'-H_{ab}); $J_{3,5} = 2.8$, $J_{5,6} = 9.2$, $J_{1',2'} = 4.1$, $J_{2',3'} = 7.5$, $J_{3',4'} = 7.5$, $J_{4',5'} = 4.7$ Hz.

 $^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz; CD_3OD):

δ = 130.3 ($\underline{\text{C}}\text{-5}$), 129.9 (C-5), 123.0 ($\underline{\text{C}}\text{-3}$), 122.6 (C-3), 119.6 (C-6), 118.2 ($\underline{\text{C}}\text{-6}$), 100.0 (C-1'), 85.4 (C-2'), 85.1 (C-4'), 74.1 (C-3'), 72.9 (C-5'), 64.2 (C-6').

MS (ESI):

m/z (%) = 292.7 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_6$: 270.11.

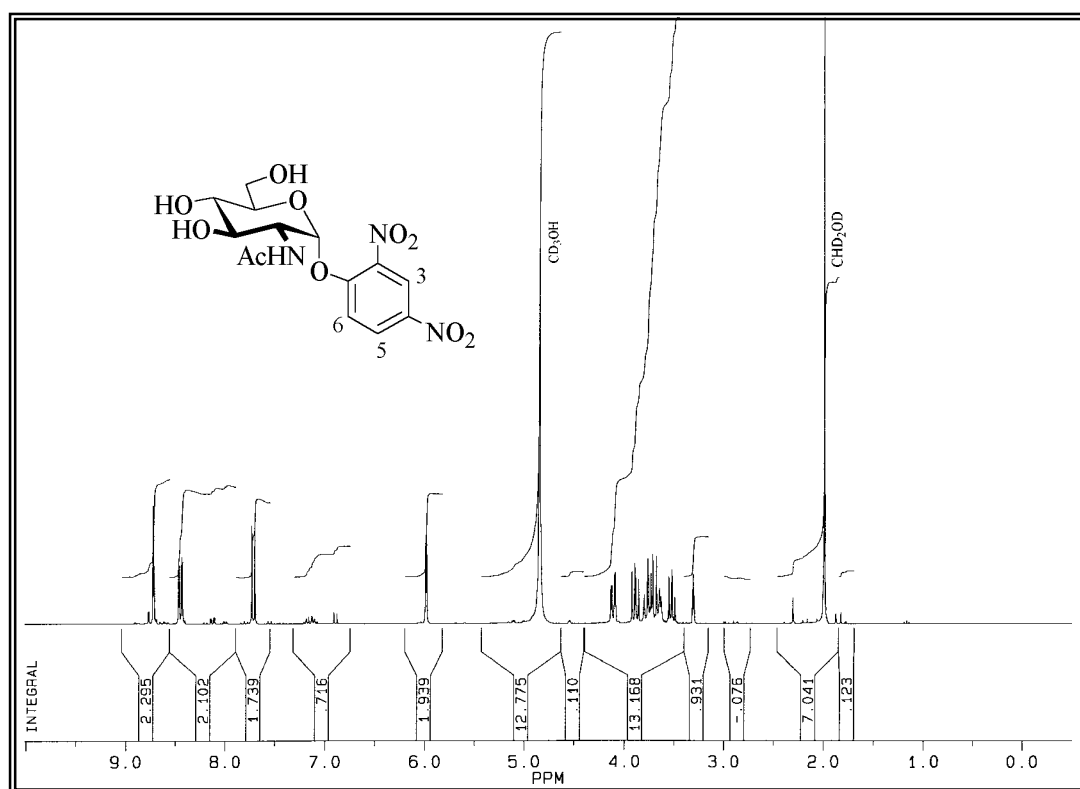
3.23. 2,4-Dinitrophenyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (α -11)*Arylierung von N-Acetyl-D-glucosamin mit DNFB nach AAV 8*

Ansatz: 1g (4.5 mmol)
 0.84 g DNFB (4.5 mmol)
 20 ml DMF und 0.58g DMPU (4.5 mmol)
 0.18 g NaH (4.5 mmol)

Reaktionsdauer: 3h

Chromatographie an Kieselgel: Toluol und dann Toluol/MeOH (12:1, 6:1 und 3:1)

Isolierte Ausbeute: 124 mg (7%) als gelblicher Feststoff

 **^1H -NMR (300 MHz, MeOD):**

δ = 8.72 (d, 3-H), 8.44 (dd, 5-H), 7.71 (d, 6-H), 5.98 (d, 1'-H), 4.10 (dd, 2'-H), 3.88 (dd, 3'-H), 3.79-3.62 (m, 6'-H_a, 6'-H_b, 5'-H), 3.52 (t, 4'-H); $J_{3,5} = 2.8$, $J_{5,6} = 9.3$, $J_{1',2'} = 3.3$, $J_{2',3'} = 10.7$, $J_{3',4'} = 8.7$ Hz.

 ^{13}C -NMR (75.4 MHz, MeOD):

δ = 174.2 (C=O), 155.4 (C-1), 142.8 (C-4), 141.1 (C-2), 130.1 (C-5), 122.6 (C-3), 119.2 (C-6), 98.9 (C-1'), 76.3 (C-5'), 72.2 (C-3'), 71.7 (C-4'), 62.3 (C-6'), 55.3 (C-2'), 22.7 (CH₃).

MS (ESI):

m/z (%) = 410.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_{10}$: 387.09.

3.24. Benzyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-xylopyranosid (12)*Galactosyltransfer mit β -Galactosidase aus E. coli*

Zu 8ml Phosphat-Puffer (1 mmol MgCl_2 , pH 7) werden 100mg α -Benzyl-D-xylosid (0.4 mmol), 250 mg NPG (0.8 mmol) und 216U β -Galactosidase gegeben. Die Lösung wird bei RT geschüttelt. Innerhalb von 4h wird ein weiteres Äquivalent NPG versetzt und noch 1h gerührt. Das Enzym wird durch Erhitzen auf 80°C (3min) denaturiert und freies Nitrophenol mit Ether extrahiert. Nicht umgesetztes α -Benzylxylosid wird durch Extraktion mit Essigester entfernt. Die wässrige Lösung wird im Vakuum eingengt und der Rückstand durch Chromatographie gereinigt.

Chromatographie an Kieselgel:	Toluol/MeOH (240/4 bis 240/40)
Chromatographie an RP-Kieselgel:	Wasser und dann Ethanol
Isolierte Ausbeute:	37 mg (23 %) als farbloser Feststoff
R_f -Wert:	0.18, Benzol/MeOH (2:1) 0.42, AcOEt/Isopropanol/H ₂ O (9:4:2) 0.5, Toluol/MeOH (1:2)
Drehwert:	$[\alpha]_D^{20} = +63.7$ (c = 1.0, Wasser)

Galactosyltransfer mit β -Galactosidase aus E. coli

Zu 2 ml Phosphat-Magnesium-Puffer (50 mM, pH 7.0) werden 65 mg Lactose (0.2 mmol), 23mg α -Benzylxylosid (0.1 mmol) und 50 U β -Galactosidase gegeben. Die Umsetzung wird bei RT durchgeführt und nach 3h ein weiteres Äquivalent Lactose zugegeben und noch 2h gerührt. Die Lösung wird kurz auf 80°C (3min) erhitzt, das nicht umgesetzte Edukt mit Essigester extrahiert und die wässrige Phase an RP-Kieselgel gereinigt.

Chromatographie an RP-Kieselgel:	Wasser, dann Ethanol/Wasser (1/99 bis 10/90)
Isolierte Ausbeute:	4 mg (15 %)

*Galactosyltransfer mit β -Galactosidase aus *E. coli**

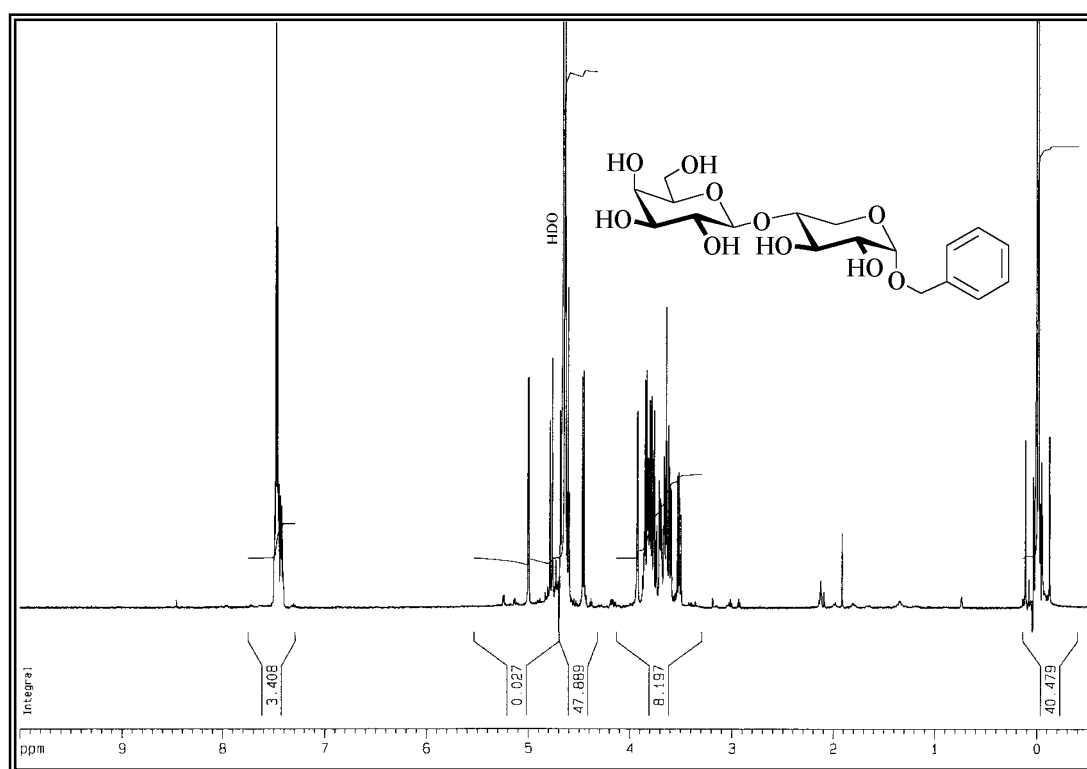
Zu 20 ml Phosphat-Magnesium-Puffer (50 mM, pH 7.0) werden 3.7g Lactose (10.8 mmol) 1g α -Benzyl-D-xylosid (4.2 mmol) und 1 ml Acetonitril gegeben. Die Lösung wird in einer Ultrafiltrationszelle mit 6,600U β -Galactosidase aus *E. coli* versetzt und bei RT für 3.5h gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit Stickstoff bei 4 bar filtriert, um das Enzym zurückzuhalten. Das α -Benzylxylosid wird aus dem Filtrat mit Essigester (3x30 ml) extrahiert und die gepufferte Lösung über RP-Kieselgelsäule chromatographiert. Durch erneutes Auffüllen der Rührzelle mit frischer Reaktionslösung konnte das Enzym vier weitere Male in den Reaktionszyklus eingesetzt werden.

Chromatographie an RP-Kieselgel:

Wasser, dann Ethanol/Wasser (4/96, 8/92 und 10/90)

Isolierte Ausbeute:

334 mg (20 %)

 **^1H -NMR (500 MHz, D_2O):**

$\delta = 7.49\text{-}7.41$ (m, H_{Ar}), 5.0 (d, $1'\text{-H}$), 4.77 (d, 1-H_a), 4.62 (d, 1-H_b), 4.46 (d, $1''\text{-H}$), 3.92 (d, $4''\text{-H}$), 3.87-3.78 (m, $6''\text{-H}_a$, $3'\text{-H}$, $5''\text{-H}$, $5'\text{-H}_a$), 3.75 (dd, $5'\text{-H}_b$), 3.70 (dd, $4'\text{-H}$), 3.66-3.63 (dd, $3''\text{-H}$; m, $6''\text{-H}_b$), 3.60 (dd, $2'\text{-H}$), 3.52 ($2''\text{-H}$); $J_{1a, 1b} = 11.7$, $J_{1', 2'} = 3.7$, $J_{2', 3'} = 9.3$, $J_{3', 4'} = 8.1$, $J_{4', 5b'} = 3.9$, $J_{5a', 5b'} = 11.8$, $J_{1'', 2''} = 7.8$, $J_{2'', 3''} = 9.8$, $J_{3'', 4''} = 3.3$ Hz.

^{13}C -NMR (125.7 MHz, D_2O):

$\delta = 139.8 (\text{C}_{\text{Ar}}), 131.6 (\text{C}_{\text{Ar}}), 131.3 (\text{C}_{\text{Ar}}), 131.16 (\text{C}_{\text{Ar}}), 104.6 (\text{C-1}'), 100.3 (\text{C-1}'), 79.6 (\text{C-3}'), 78.1 (\text{C-4}'), 75.5 (\text{C-3}'), 74.3 (\text{C-5}'), 74.0 (\text{C-2}'), 73.5 (\text{C-2}'), 72.6 (\text{C-1}), 71.5 (\text{C-4}'), 63.9 (\text{C-5}'), 62.0 (\text{C-6}')$.

MS (ESI):

m/z (%) = 425.3 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$: 402.15.

3.25. Benzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3-*O*-diacetyl- α -D-xylopyranosid (12_{Ac})

Peracetylierung von 12 nach AAV 9

40 mg (0.1 mmol)

2 ml Acetanhydrid

Umkristallisation:

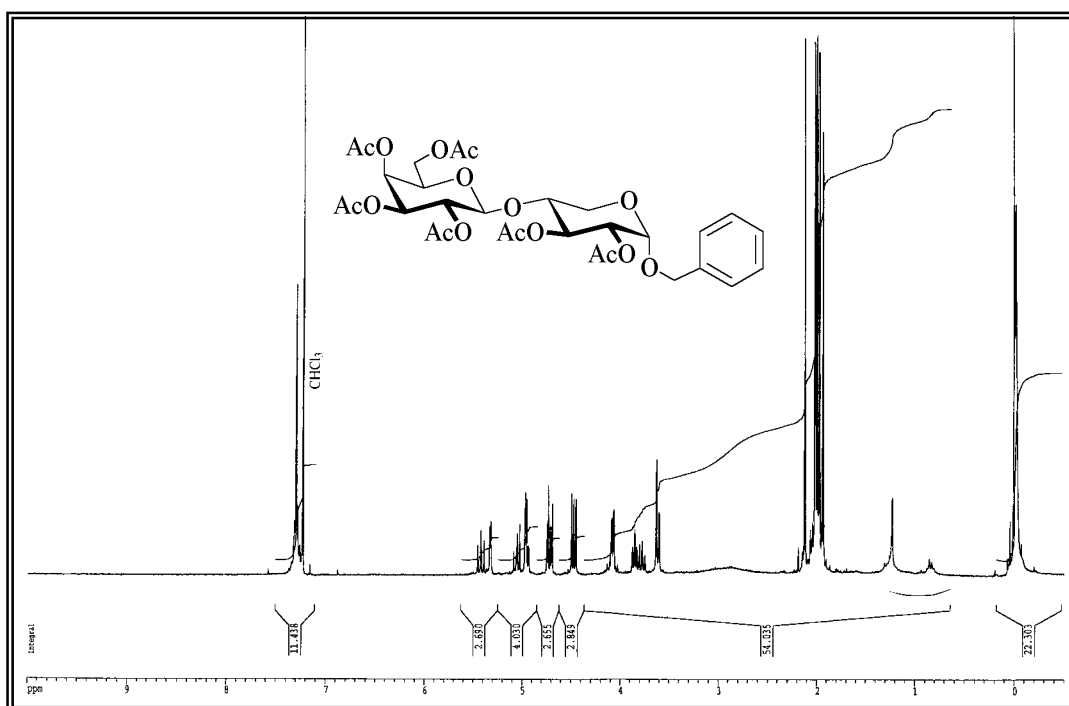
aus Diethylether/Petrolether

Isolierte Ausbeute:

95 mg (95%)

R_f -Wert:

0.47, Chloroform/MeOH (40:1)

 **^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3):**

$\delta = 7.35\text{--}7.23$ (m, H_{Ar}), 5.42 (t, 3'-H), 5.33 (dd, 4''-H), 5.06 (dd, 2''-H), 4.96 (dd, 3''-H), 4.93 (d, 1'-H), 4.73 (dd, 2'-H), 4.71 (d, 1- H_a), 4.47 (d, 1- H_b), 4.46 (d, 1''-H), 4.08 (dd, 6''- H_a ; m, 6''- H_b), 3.86 (dd, 5''-H), 3.78 (dd, 4'-H), 3.62 (d, 5'- H_{ab}); $J_{1a, 1b} = 12.2$, $J_{1', 2'} = 3.3$, $J_{2', 3'} = 10.2$, $J_{3', 4'} = 9.4$, $J_{4', 5a'} = 7.6$, $J_{5a', 5b'} = 8.0$, $J_{1'', 2''} = 7.6$, $J_{2'', 3''} = 10.4$, $J_{3'', 4''} = 3.4$, $J_{4'', 5''} = 0.9$, $J_{5'', 6a''} = 6.6$, $J_{5'', 6b''} = 7.1$ Hz.

^{13}C -NMR (75.4 MHz, CDCl_3):

δ = 172.2 (C=O), 138.9 (C_{Ar}), 130.4 (C_{Ar}), 129.9 (C_{Ar}), 129.7 (C_{Ar}), 103.1 (C-1''), 96.9 (C-1'), 79.1 (C-4'), 73.1 (C-5''), 72.9 (C-2'), 72.8 (C-3''), 72.1 (C-3'), 71.6 (C-1), 71.1 (C-2''), 68.9 (C-4''), 63.2 (C-6''), 61.4 (C-5'), 22.6 (CH_3).

$\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{O}_{16}$: 654.22.

3.26. β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-xylopyranosid (13)*Entschützung von 12 durch Hydrierung*

Zu einer Lösung von 5 ml Ethanol, 5 ml Wasser und 0.25 ml Essigsäure werden 400mg Palladium auf Kohlenstoff (10%) und 160 mg Disaccharid **12** (0.4 mmol) gegeben. Die Suspension wird bei 50°C unter 60 bar Wasserstoffdruck gerührt. Nach 24h wird das Reaktionsgemisch über Kieselgur filtriert und das Filtrat in Vakuum eingeeengt. Der erhaltene Rückstand wird an RP-Kieselgel chromatographiert, wobei das freie Disaccharid **13** mit Wasser eluiert wird. Durch Elution mit Ethanol wird das nicht umgesetzte Edukt wiedergewonnen.

Umkristallisation:	aus Aceton
Isolierte Ausbeute:	99 mg (80%)
R_f -Wert:	0.11, EE/Isopropanol/ H_2O (3/2/2)

 ^1H -NMR (300 MHz, D_2O):

δ = 4.56 (d, 1''-H; $J_{1',2'} = 7.3$), 3.97-3.56 (m, 12 H).

 ^{13}C -NMR (75.4 MHz, D_2O):

δ = 105.189 (C-1''), 82.912 (C-1'), 77.946, 75.396, 74.713, 73.757, 72.695, 71.452, 65.478, 63.885, 63.437.

$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$: 312.11.

VI. Literatur

- [1] Pazur, J.H. »Anti-carbohydrate antibodies with specificity for monosaccharide and oligosaccharide units of antigens« *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1998**, 53, 201-261.
- [2] Pozsgay, V. »Oligosaccharide-protein conjugates as vaccine candidates against bacteria« *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2000**, 56, 153-199.
- [3] Flitsch, S.L. »Chemical and enzymatic synthesis of glycopolymers« *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 619-625.
- [4] Varki, A. »Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct« *Glycobiology* **1993**, 3, 97-130.
- [5] Dwek, R.A. »Glycobiology: toward understanding the function of sugars« *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683-720.
- [6] Herzner, H.; Reipen, T.; Schultz, M.; Kunz, H. »Synthesis of glycopeptides containing carbohydrate and peptide recognition motifs« *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4495-4537.
- [7] Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D. »Molekularbiologie der Zelle« Jaenicke, L. (Ed.); VCH: Weinheim, **1990**.
- [8] Lehmann, J. »Chemie und Biologie -2. Neubearb. und erw.-« Thieme, G.: Stuttgart; New York, **1996**.

-
- [9] Takagaki, K.; Tazawa, T.; Munakata, H.; Nakamura, T.; Endo, M. »Effect of monensin on the synthesis of β -D-xyloside: initiated glycosaminoglycan and its linkage region oligosaccharides in human skin fibroblasts« *J. Biochem.* **1997**, *122*, 1129-1132.
- [10] Moses, J.; Oldberg, Å.; Fransson, L.-Å. »Initiation of galactosaminoglycan biosynthesis: separate galactosylation and dephosphorylation pathways for phosphoxylosylated decorin protein and exogenous xyloside« *Eur. J. Biochem.* **1999**, *260*, 879-884.
- [11] Lindberg, B.; Rodén, L.; Silvander, B.-G. »Synthesis of oligosaccharides containing galactose and xylose« *Carbohydr. Res.* **1966**, *2*, 413-417.
- [12] Ekborg, G.; Curenton, T.; Krishna, N.R.; Rodén, L. »Synthesis of *O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-L-serine (Gal-Gal-Xyl-Ser)« *J. Carbohydr. Chem.* **1990**, *9(1)*, 15-37.
- [13] Di Sant' Agnese, P.A.; Davis, P.B. *New Engl. J. Med.* **1976**, *295*, 597.
- [14] Hanessian, S. »Total synthesis of natural products the chiron approach« Pergamon: Oxford, **1983**.
- [15] Scott, J.W. *In Asymmetric synth.*; Morrison, J.D. (Ed.); Academic press: Orlando, **1984**; Vol. 4; pp. 1-226.
- [16] Toshima, K.; Tatsuta, K. »Recent progress in *O*-glycosylation methods and its application to natural products synthesis« *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1503-1531.
- [17] Bols, M. »Carbohydrate building blocks« Wiley: New York, **1996**.
- [18] Boons, G.J.; Isles, S. »Vinyl glycosides in oligosaccharide synthesis. 2. the use of allyl and vinyl glycosides in oligosaccharide synthesis« *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4262-4271.

-
- [19] Huchel, U.; Schmidt, C.; Schmidt, R.R. »Synthesis of hetaryl glycosides and their glycosyl donor properties« *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1353-1360.
- [20] Hanessian, S.; Lou, B. »Stereocontrolled glycosyl transfer reactions with unprotected glycosyl donors« *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4443-4463.
- [21] Davis, B.G. »Recent developments in oligosaccharide synthesis« *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **2000**, 2137-2160.
- [22] Wymer, N.; Toone, E.J. »Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates« *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 110-119.
- [23] Ye, X.-S.; Wong, C.-H. »Anomeric reactivity-based one-pot oligosaccharide synthesis: a rapid route to oligosaccharide libraries« *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2410-2431.
- [24] Bernstein, M.A.; Hall, L.D. »A general synthesis of model glycoproteins: coupling of alkenyl glycosides to proteins, using reductive ozonolysis followed by reductive amination with sodium cyanoborohydride« *Carbohydr. Res.* **1980**, *78*, C1-C3.
- [25] Gigg, J.; Gigg, R.; Payne, S.; Conant, R. »The allyl group for protection in carbohydrate chemistry. Part 19.¹ The coupling of allyl-2,3-di-*O*-methyl-4-*O*-(3,6-di-*O*-methyl- β -D-glucopyranosyl)- α -L-rhamnopyranoside to bovine serum albumin. Preparation of a diagnostic reagent for antibodies to the major glycolipid of *Mycobacterium leprae* (the Leprosy Bacillus) in human sera« *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1987**, 1165-1170.
- [26] Aspinall, G.O.; Crane, A.M.; Gammon, D.W.; Ibrahim, I.H.; Khare, N.K. »Synthesis of allyl glycosides for conversion into neoglycoproteins bearing epitopes of mycobacterial glycolipid antigens« *Carbohydr. Res.* **1991**, *216*, 337-355.
- [27] Gigg, J.; Gigg, R. »The allyl ether as a protecting group in carbohydrate chemistry« *J. Chem. Soc.* **1966**, (C), 82-86.

-
- [28] a) Warren, C.D.; Jeanloz, R.W. »The synthesis of allyl 2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glucopyranoside and of chitobiose derivatives by the oxazoline procedure« *Carbohydr. Res.* **1977**, *53*, 67-84; b) Warren, C.D.; Shaban, M.A.E.; Jeanloz, R.W. »The synthesis and properties of benzylated oxazolines derived from 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose« *Carbohydr. Res.* **1977**, *59*, 427-448.
- [29] Bessell, E.M.; Westwood, J.H. »(*R,S*)-2,3-Epoxypropyl ethers and glycosides of D-glucopyranose« *Carbohydr. Res.* **1972**, *25*, 11-21.
- [30] Lee, R.T.; Lee, Y.C. »Synthesis of 3-(2-aminoethylthio)propyl glycosides« *Carbohydr. Res.* **1974**, *37*, 193-201.
- [31] Eichler, E.; Kihlberg, J.; Bundle, D.R. »Access to fluorescent probes via allyl glycosides: the synthesis of a *Brucella* trisaccharide epitope linked to a coumarin« *Glycoconjugate J.* **1991**, *8*(2), 69-74.
- [32] Gurjar, M.K.; Mainkar, A.S. »Catalytic Osmylation of allyl D-glucopyranoside« *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 21-24.
- [33] Moitessier, N.; Chrétien, F.; Chapleur, Y.; Humeau, C. »Synthesis and biological activities of inositol 1,4,5-trisphosphate mimics related to xylopyranosides« *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*(44), 8023-8026.
- [34] Moitessier, N.; Chrétien, F.; Chapleur, Y. »Asymmetric dihydroxylation of D-xylose-derived allyl ethers« *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*(17), 2889-2892.
- [35] Petersen, M. »Chemoenzymatische Synthesen nicht-natürlicher Kohlenhydrate« Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, **1997**; pp. 356.
- [36] Huang, G.; Hollingsworth, R.I. »The stereoselective conversion of 2-alkenyl alcohols to (*R*)- or (*S*)-alkane-1,2-diols using D-glucose as a chiral auxiliary« *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 581-584.

-
- [37] Farkas, E.; Thiem, J. »Enzymatic synthesis of galactose-containing disaccharides employing β -galactosidase from *Bacillus circulans*« *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 3073-3077.
- [38] Farkas, E.; Thiem, J.; Krzewinski, F.; Bouquelet, S. »Enzymatic synthesis of Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc derivatives utilising a phosphorylase from *Bifidobacterium bifidum* 20082« *Synlett* **2000**, 728-730.
- [39] Fraser-Reid, B.; Udodong, U.E.; Wu, Z.; Ottoson, H.; Merritt, J.R.; Rao, C.S.; Roberts, C.; Madsen, R. »*n*-Pentenyl glycosides in organic chemistry: a contemporary example of serendipity« *Synlett* **1992**, 927-942.
- [40] Fraser-Reid, B.; Merritt, J.R.; Handlon, A.L.; Andrews, C.W. »The chemistry of N-pentenyl glycosides: synthetic, theoretical, and mechanistic ramifications« *Pure Appl. Chem.* **1993**, 65, 779-786.
- [41] Madsen, R.; Fraser-Reid, B. »*n*-Pentenyl glycosides in oligosaccharide synthesis« *Front. Nat. Prod. Res.* **1996**, 1, 155-170.
- [42] Allen, J.G.; Fraser-Reid, B. »*n*-Pentenyl glycosyl orthoesters as versatile intermediates in oligosaccharide synthesis. The proteoglycan linkage region« *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 468-469.
- [43] Buskas, T.; Söderberg, E.; Konradsson, P.; Fraser-Reid, B. »Use of *n*-pentenyl glycosides as precursors to various spacer functionalities« *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 958-963.
- [44] Marino-Albernas, J.R.; Bittman, R.; Peters, A.; Mayhew, E. »Synthesis and growth inhibitory of glycosides of 1-*O*-hexadecyl-2-*O*-methyl-sn-glycerol, analogs of the antitumor ether lipid Et-18-OCH₃ (edelfosine)« *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 3241-3247.

-
- [45] Usui, T.; Kubota, S.; Ohi, H. »A convenient synthesis of β -D-galactosyl disaccharide derivatives using the β -D-galactosidase from *Bacillus circulans*« *Carbohydr. Res.* **1993**, *244*, 315-323.
- [46] Fukase, K.; Yasukochi, T.; Nakai, Y.; Kusumoto, S. »*p*-Nitrophenyl group for anomeric protection of oligosaccharides, selective oxidative cleavage via *p*-acetamidophenyl glycosides« *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*(19), 3343-3344.
- [47] Kimura, T.; Takayama, S.; Huang, H.; Wong, C.-H. »A practical method for the synthesis of N-acetyl-D-lactosamine derivatives by the tandem use of galactose oxidase and β -galactosidase« *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2348-2350.
- [48] Binder, W.H.; Kählig, H.; Schmid, W. »Galactosylation by use of β -galactosidase: chemo-enzymatic syntheses of di- and trisaccharides« *Tetrahedron* **1994**, *50*, 10407-10418.
- [49] Akita, H.; Kurashima, K.; Nakamura, T.; Kato, K. »Chemoenzymatic syntheses of naturally occurring β -glucosides« *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 2429-2439.
- [50] Singh, S.; Scigelova, M.; Crout, D.H.G. »Glycosidase-catalysed synthesis of α -galactosyl epitopes important in xenotransplantation and toxin binding using the α -galactosidase from *Penicillium multicolor*« *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1999**, 2065-2066.
- [51] Zeng, X.; Yoshino, R.; Murata, T.; Ajisaka, K.; Usui, T. »Regioselective synthesis of *p*-nitrophenyl glycosides of β -D-galactopyranosyl-disaccharides by transglycosylation with β -D-galactosidases« *Carbohydr. Res.* **2000**, *325*, 120-131.
- [52] Hakamata, W.; Nishio, T.; Oku, T. »Hydrolytic activity of α -galactosidases against deoxy derivatives of *p*-nitrophenyl α -D-galactopyranoside« *Carbohydr. Res.* **2000**, *324*, 107-115.

-
- [53] Kitamura, N.; Ota, Y.; Haratake, A.; Ikemoto, T.; Tanno, O.; Horikoshi, T. »Effects of ethyl α -D-glucoside on skin barrier disruption« *Skin Pharmacol* **1997**, *10*, 153-159.
- [54] Ikeda, T.; Ando, J.; Miyazono, A.; Zhu, X.-H.; Tsumagari, H.; Nohara, T.; Yokomizo, K.; Uyeda, M. »Anti-herpes virus activity of Solanum steroidal glycosides« *Biol. Pharm. Bull.* **2000**, *23*(3), 363-364.
- [55] a) Fischer, E. »Ueber die Glucoside der Alkohole« *Ber.* **1893**, *26*, 2400-2412; b) Fischer, E. »Über die Verbindungen der Zucker mit den Alkoholen und Ketonen« *Ber.* **1895**, *28*, 1145-1167.
- [56] Koenigs, W.; Knorr, E. »Ueber einige Derivate des Traubenzuckers und der Galactose« *Ber* **1901**, *34*, 957-981.
- [57] Igarashi, K. »The Koenigs-Knorr reaction« *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1977**, *34*, 243-283.
- [58] Lemieux, R.U.; Hendriks, K.B.; Stick, R.V.; James, K. »Halide ion catalyzed glycosidation reactions. Synthesis of α -linked disaccharides« *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4056-4062.
- [59] Flitsch, S.L.; Watt, G.M. »Enzymes in Carbohydrate Chemistry: Formation of Glycosidic Linkages« *In Biotechnology*; Kelly, D.R. (Ed.); Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Germany, **2000**; Vol. 8b; pp. 243-274.
- [60] Thiem, J. »Applications of enzymes in synthetic carbohydrate chemistry« *FEMS Microbiol. Rev.* **1995**, *16*(2-3), 193-211.
- [61] Coutinho, P.M.; Henrissat, B. »Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach« *Spec. Publ. - R. Soc. Chem.* **1999**, *246*, 3-12.

- [62] Srivastava, G.; Alton, G.; Hindsgaul, O. »Combined chemical-enzymic synthesis of deoxygenated oligosaccharide analogs: transfer of deoxygenated D-GlcpNAc residues from their UDP-GlcpNAc derivatives using *N*-acetylglucosaminyltransferase I« *Carbohydr. Res.* **1990**, 207, 259-276.
- [63] McGarvey, G.J.; Wong, C.-H. »Chemical, enzymatic and structural studies in molecular glycobiology« *Liebigs Ann. Chem.* **1997**, 1059-1074.
- [64] Křen, V.; Thiem, J. »Glycosylation employing bio-systems: from enzymes to whole cells« *Chem. Soc. Rev.* **1997**, 26(6), 463-473.
- [65] Michael, A. *Am. Chem. J.* **1879**, 1, 305-312.
- [66] Dess, D.; Kleine, H.P.; Weinberg, D.V.; Kaufman, R.J.; Sidhu, R.S. »Phase-transfer catalyzed synthesis of acetylated aryl β -D-glucopyranosides and aryl β -D-galactopyranosides« *Synthesis* **1981**, 883-885.
- [67] Roy, R.; Tropper, F. »Stereospecific synthesis of aryl β -D-acetylglucopyranosides by phase transfer catalysis« *Synth. Commun.* **1990**, 20(14), 2097-2102.
- [68] Zemplén, G.; Gerecs, A. »Einwirkung von Quecksilbersalzen auf Acetohalogenzucker, IV. Mittel.: Direkte Darstellung der Alkylbioside der α -Reihe« *Ber.* **1930**, 63, 2720-2729.
- [69] Zemplén, G.; Csürös, Z. »Synthesen in der Kohlenhydrat-Gruppe mit Hilfe von sublimiertem Eisenchlorid, II. Mittel.: Darstellung der Cellobioside der α -Reihe« *Ber.* **1931**, 64, 993-1000.
- [70] Zemplén, G. »Neuere Ergebnisse der Kohlenhydratforschung« *Ber.* **1941**, 74A, 75-92.
- [71] Helferich, B.; Wedemeyer, K.F. *Ann.* **1949**, 563, 139-145.
- [72] Helferich, B.; Weis, K. »Zur Synthese von Glucosiden und von nicht-reduzierenden Disacchariden« *Chem. Ber.* **1956**, 89, 314-321.

-
- [73] Helferich, B.; Zirner, J. »Zur Synthese von Tetraacetyl-hexosen mit freiem 2-Hydroxyl. Synthese einiger Disaccharide« *Chem. Ber.* **1962**, *95*, 2604-2611.
- [74] Lemieux, R.U. »Methods in carbohydrate chemistry« Whistler, R.L.; Wolfrom, M.L.; BeMiller, J.N. Eds.; Academic press: New York, **1963**; *Vol. II*; pp. 221.
- [75] Concie, J.; Levy, G.A. »Methods in carbohydrate chemistry« Whistler, R.L.; Wolfrom, M.L.; BeMiller, J.N. Eds.; Academic press: New York, **1963**; *Vol. II*; pp. 335.
- [76] Schmidt, R.R.; Gaden, H.; Jatzke, H. »Glycosylimidates. 45. New catalysts for the glycosyl transfer with *O*-glycosyl trichloroacetimidates« *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*(3), 327-330.
- [77] Schmidt, R.R. »Anomeric-oxygen activation for glycoside synthesis: the trichloroacetimidate method« *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 21-123.
- [78] Tsuchiya, T. »Chemistry and developments of fluorinated carbohydrates« *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1990**, *48*, 91-277.
- [79] Kunz, H.; Sager, W. »Stereoselective glycosylation of alcohols and silylethers using glycosyl fluorides and boron trifluoride etherate« *Helv. Chim. acta* **1985**, *68*, 283-287.
- [80] Kobayashi, S.; Kashiwa, K.; Kawasaki, T.; Shoda, S.-I. »Novel method for polysaccharide synthesis using an enzyme: the first in vivo synthesis of cellulose via a nonbiosynthetic path utilizing cellulase as catalyst« *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3079-3084.
- [81] Friesen, R.W.; Danishefsky, S.J. »On the controlled oxidative coupling of glycals: a new strategy for the rapid assembly of oligosaccharides« *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6656-6660.
- [82] Halcomb, R.L.; Danishefsky, S.J. »On the direct epoxidation of glycals: application of a reiterative strategy for the synthesis of β -linked oligosaccharides« *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6661-6666.

- [83] Kahne, D.; Walker, S.; Cheng, Y.; van Engen, D. »Glycosylation of unreactive substrates« *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6881-6882.
- [84] Raghavan, S.; Kahne, D. »A one-step synthesis of the ciclamycin trisaccharide« *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1580-1581.
- [85] Marra, A.; Esnault, J.; Veyrières, A.; Sinaÿ, P. »Isopropenylglycosides and congeners as novel classes of glycosyl donors: theme and variations« *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6354-6360.
- [86] Martin, T.J.; Schmidt, R.R. »Efficient sialylation with phosphite as leaving group« *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6123-6126.
- [87] Sim, M.M.; Kondo, H.; Wong, C.-H. »Synthesis and use of glycosyl phosphites: an effective route to glycosyl phosphates, sugar nucleotides, and glycosides« *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2260-2267.
- [88] Kondo, H.; Aoki, S.; Ichikawa, Y.; Halcomb, R.L.; Ritzen, H.; Wong, C.-H. »Glycosyl phosphites as glycosylation reagents: scope and mechanism« *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 864-877.
- [89] Nicolaou, K.C.; Seitz, S.P.; Papahatjis, D.P. »A mild and general method for the synthesis of *O*-glycosides« *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*(8), 2430-2434.
- [90] Nicolaou, K.C.; Dolle, R.E.; Papahatjis, D.P.; Randall, J.L. »Practical synthesis of oligosaccharides. Partial synthesis of avermectin B_{1a}« *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4189-4192.
- [91] Garegg, P.J. »Thioglycosides as glycosyl donors in oligosaccharide synthesis« *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1997**, *52*, 179-205.
- [92] Barresi, F.; Hindsgaul, O. »Glycosylation methods in oligosaccharide synthesis« *In Modern synthetic methods*; Ernst, B.; Leumann, C. (Eds.); Helv. Chim. Acta: Basel, **1995**; Vol. 7; pp. 281-330.

-
- [93] Rivera-Sagredo, A.; Fernández-Mayoralas, A.; Jiménez-Barbero, J.; Martín-Lomas, M. »4-*O*- β -D-Galactopyranosyl-D-xylose: a new synthesis and application to the evaluation of intestinal lactase« *Carbohydr. Res.* **1992**, 228, 129-135.
- [94] Bishop, C.T.; Cooper, F.P. »Glycosidation of sugars I. formation of methyl-D-xylosides« *Can. J. Chem.* **1962**, 40, 224-232.
- [95] Green, J.W. »The glycofuranosides« *Adv. Carbohydr. Chem.* **1966**, 21, 95-142.
- [96] Helferich, B.; Kashelikar, D.V. »Über eine neue Methode zur Synthese von α -Glykosiden« *Chem. Ber.* **1957**, 90, 2094-2096.
- [97] Gross, P.H.; Jeanloz, R.W. »Optically pure *N*-substituted derivatives of benzyl 2-amino-2-deoxy- α - and - β -D-glucopyranoside« *J. Org. Chem.* **1967**, 32, 2759-2763.
- [98] Takano, T.; Nakatsubo, F.; Murakami, K. »A facile allyl β -glycosylation in the presence of a benzyl protecting group, using boron trifluoride etherate« *Carbohydr. Res.* **1990**, 203, 341-342.
- [99] Bertho, J.-N.; Ferrières, V.; Plusquellec, D. »A new synthesis of D-glycosiduronates from unprotected D-uronic acids« *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1391-1393.
- [100] Ferrières, V.; Bertho, J.-N.; Plusquellec, D. »A new synthesis of *O*-glycosides from totally *O*-unprotected glycosyl donors« *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 2749-2752.
- [101] Sharma, S.K.; Corrales, G.; Penadés, S. »Single step stereoselective synthesis of unprotected 2,4-dinitrophenyl glycosides« *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 5627-5630.
- [102] Huchel, U.; Schmidt, C.; Schmidt, R.R. »Direct anomeric *O*-arylation and *O*-hetarylation of glucose: electron deficient aromatic and hetaromatic compounds in aryl and hetaryl glycoside synthesis« *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 9457-9460.
- [103] Nilsson, K.G.I. »Enzymic synthesis of di- and tri-saccharide glycosides, using glycosidases and β -D-galactoside 3- α -sialyl-transferase« *Carbohydr. Res.* **1989**, 188, 9-17.

-
- [104] Gygax, D.; Spies, P.; Winkler, T.; Pfaar, U. »Enzymatic synthesis of β -D-glucuronides with in situ regeneration of uridine-5'-diphosphoglucuronic acid« *Tetrahedron* **1991**, *47*, 5119-5123.
- [105] Waldmann, H. »Enzymatic synthesis of O-glycosides« *In Org. Synth. Highlights*, **1995**; Vol. II; pp. 157-166.
- [106] Knorst, M. »Neue Enzyme zur Synthese von sialinsäurehaltigen Oligosacchariden« Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, **1999**; pp. 242.
- [107] Ichikawa, Y.; Lin, Y.C. »Regeneration of sugar nucleotide for enzymatic oligosaccharide synthesis« *Methods Enzymol.* **1994**, *247*, 107-127.
- [108] Kragl, U.; Gyax, D.; Ghisalba, O.; Wandray, C. »Enzymatic two-step synthesis of N-acetyl neuraminic acid in the enzyme membrane reactor« *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 827-828.
- [109] Wong, C.; Halcomb, R.L.; Ichikawa, Y.; Kajimoto, T. »(Part 2) Enzymes in organic synthesis: application to the problems of carbohydrate recognition« *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 521-546.
- [110] Legler, G. »Glycoside hydrolases: mechanistic information from studies with reversible and irreversible inhibitors« *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1990**, *48*, 319-384.
- [111] Hehre, E.J. »A fresh understanding of the stereochemical behavior of glycosylases: structural distinction of "inverting" (2-MCO-TYPE) versus "retaining" (1-MCO-TYPE) enzymes« *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1999**, *55*, 265-310.
- [112] Fischer, E.; Thierfelder, H. »Verhalten der verschiedenen Zucker gegen reine Hefen« *Ber.* **1894**, *27*, 2031-2037.
- [113] Fischer, E. »Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme« *Ber.* **1894**, *27*, 2985-2993.

-
- [114] Lemieux, R.U.; Spohr, U. »How Emil Fischer was led to the lock and key concept for enzyme specificity« *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 1-20.
- [115] Bedine, M.S.; Bayless, T.M. *Gastroenterology* **1974**, *65*, 735-743.
- [116] Gray, G.M. »The metabolic bases of inherited diseases« Stainbury, J.B.; Wyndgaarden, J.B.; Fredrickson, D.S. (Eds.); McGraw-Hill: New York, **1974**; pp. 1526-1536.
- [117] Menzies, I.S. »Developments in sweeteners-2« Grenby, T.H.; Parker, K.J.; Lindley, M.G. (Eds.); Applied Science Publishers: Barking, **1983**; pp. 89-117.
- [118] Ryan, M.A. »Living with lactose intolerance« *Modern Drug Discovery* **1999**, 87-91.
- [119] Zhou, Q.Z.K.; Chen, X.D. »Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*« *Biochem. Eng. J.* **2001**, *9*, 33-40.
- [120] Szczodrak, J. »Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*« *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *10*, 631-637.
- [121] Crout, D.H.G.; Vic, G. »Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharide synthesis« *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 98-111.
- [122] van Rantwijk, F.; Woudenberg-van Oosterom, M.; Sheldon, R.A. »Glycosidase-catalyzed synthesis of alkyl glycosides« *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, *6(6)*, 511-532.
- [123] Vic, G.; Thomas, D. »Enzyme-catalyzed synthesis of alkyl β -D-glucosides in organic media« *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33(32)*, 4567-4570.
- [124] Ljunger, G.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B. »Enzymatic synthesis of octyl- β -glucoside in octanol at controlled water activity« *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, *16*, 751-755.

- [125] Vic, G.; Thomas, D.; Crout, D.H.G. »Solvent effect on enzyme-catalyzed synthesis of β -D-glucosides using the reverse hydrolysis method: application to the preparative-scale synthesis of 2-hydroxybenzyl and octyl β -D-glucopyranosides« *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, 20, 597-603.
- [126] Gibson, R.R.; Dickinson, R.P.; Boons, G.-J. »Vinyl glycosides in oligosaccharide synthesis (part 4): glycosidase-catalysed preparation of substituted allyl glycosides« *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 3357-3360.
- [127] Kildemark, N.; Nilsson, K.G.I. »Enzymic synthesis of β -D-mannopyranosides and benzyl β -D-glycopyranoside by reverse hydrolysis in aqueous-organic systems« *Carbohydr. Lett.* **1998**, 3(3), 211-216.
- [128] Garcia-Garibay, M.; Lopez-Munguia, A.; Barzana, E. »Alcoholysis and reverse hydrolysis reactions in organic one-phase system with a hyperthermophilic β -glycosidase« *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, 69(6), 627-632.
- [129] Singh, S.; Scigelova, M.; Crout, D.H.G. »Glycosidase-catalyzed synthesis of mannobioses by the reverse hydrolysis activity of α -mannosidase: partial purification of α -mannosidases from almond meal, limpets and *Aspergillus niger*« *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11(1), 223-229.
- [130] Vic, G.; Crout, D.H.G. »Synthesis of allyl and benzyl β -D-glucopyranosides, and allyl β -D-galactopyranoside from D-glucose or D-galactose and the corresponding alcohol using almond β -D-glucosidase« *Carbohydr. Res.* **1995**, 279, 315-316.
- [131] Vic, G.; Hastings, J.J.; Crout, D.H.G. »Glycosidase-catalyzed synthesis of glycosides by an improved procedure for reverse hydrolysis: application to the chemoenzymic synthesis of galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O- α -galactopyranoside derivatives« *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7(7), 1973-1984.

-
- [132] Ajisaka, K.; Fujimoto, H.; Noshida, H. »Enzymic synthesis of disaccharides by use of the reverse hydrolysis activity of β -D-galactosidases« *Carbohydr. Res.* **1988**, *180*, 35-42.
- [133] Ajisaka, K.; Fujimoto, H. »Regioselective synthesis of trehalose-containing trisaccharides using various glycohydrolases« *Carbohydr. Res.* **1990**, *199*, 227-234.
- [134] Nilsson, K.G.I. »Enzymic synthesis of oligosaccharides« *Trends Biotechnol.* **1988**, *6(10)*, 256-264.
- [135] Stevenson, D.E.; Furneaux, R.H. »Synthesis of allyl β -D-galactopyranoside from lactose using *Streptococcus thermophilus* β -D-galactosidase« *Carbohydr. Res.* **1996**, *284*, 279-283.
- [136] Millqvist-Fureby, A.; Gill, I.S.; Vulfson, E.N. »Enzymic transformations in supersaturated substrate solutions: I. A general study with glycosidases« *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *60(2)*, 190-196.
- [137] Gill, I.; Valivety, R. »Enzymatic glycosylation in plasticized glass phases: a novel and efficient route to *O*-glycosides« *Angew. Chem.* **2000**, *112(21)*, 3962-3966.
- [138] Williams, S.J.; Withers, S.G. »Glycosyl fluorides in enzymatic reactions« *Carbohydr. Res.* **2000**, *327(1-2)*, 27-46.
- [139] Akita, H.; Kurashima, K.; Nakamura, T.; Kato, K. »Chemoenzymatic syntheses of naturally occurring β -glucosides« *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 2429-2439.
- [140] Nilsson, K.G.I. »A simple strategy for changing the regioselectivity of glycosidase-catalyzed formation of disaccharides. Part II. Enzymic synthesis in situ of various acceptor glycosides« *Carbohydr. Res.* **1988**, *180(1)*, 53-59.
- [141] Nilsson, K.G.I. »A simple strategy for changing the regioselectivity of glycosidase-catalyzed formation of disaccharides« *Carbohydr. Res.* **1987**, *167*, 95-103.

- [142] López, R.; Fernández-Mayoralas, A. »Controlling yield and regioselectivity in the enzymatic synthesis of β -D-galactopyranosyl- β -D-xylopyranosides« *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33(37), 5449-5452.
- [143] López, R.; Fernández-Mayoralas, A. »Enzymatic β -galactosidation of modified monosaccharides: study of the enzyme selectivity for the acceptor and its application to the synthesis of disaccharides« *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 737-745.
- [144] Yasukochi, T.; Fukase, K.; Suda, Y.; Takagaki, K.; Endo, M.; Kusumoto, S. »Enzymatic synthesis of 4-methylumbelliferyl glycosides of trisaccharide and core tetrasaccharide, Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)Xyl and GlcA(β 1-3)Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)Xyl, corresponding to the linkage region of proteoglycans« *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1997**, 70, 2719-2725.
- [145] Yasukochi, T.; Inaba, C.; Fukase, K.; Kusumoto, S. »Nitropyridyl glycosides: new glycosyl donors for enzymic transglycosylation« *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40(36), 6585-6589.
- [146] Hernaiz, M.J.; Crout, D.H.G. »A highly selective synthesis of *N*-acetyllactosamine catalyzed by immobilised β -galactosidase from *Bacillus circulans*« *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, 10, 403-408.
- [147] Mori, T.; Okahata, Y. »A variety of lipid-coated glycoside hydrolases as effective glycosyl transfer catalysts in homogeneous organic solvents« *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38(11), 1971-1974.
- [148] Mori, T.; Fukusho, S.; Kojima, J.; Okahata, Y. »Enzymatic syntheses of glycolipids catalyzed by a lipid-coated glycoside hydrolase in the organic-aqueous two phase system« *Polym. J.* **1999**, 31(11-2), 1105-1108.
- [149] Ballou, C.E. »Alkali-sensitive glycosides« *Adv. Carbohydr. Chem.* **1954**, 9, 59-95.

-
- [150] Feather, M.S.; Harris, J.F. »The acid-catalyzed hydrolysis of glycopyranosides« *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 153-157.
- [151] Namchuk, M.N.; McCarter, J.D.; Becalski, A.; Andrews, T.; Withers, S.G. »The role of sugar substituents in glycoside hydrolysis« *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1270-1277.
- [152] Namchuk, M.N.; Withers, S.G. »Mechanism of *Agrobacterium* β -glucosidase: kinetic analysis of the role of noncovalent enzyme/substrate interactions« *Biochemistry* **1995**, *34*, 16194-16202.
- [153] Zechel, D.; Withers, S.G. »Mechanisms of glycosyl transfer« *In Comprehensive Natural Products Chemistry* Barton, D.; Nakanishi, K.; Poulter, C.D. (Eds.); Elsevier, **1999**; Vol. 5, Chapter 12, pp. 279-314.
- [154] Withers, S.G. »Understanding and exploiting glycosidases« *Can. J. Chem.* **1999**, *77(1)*, 1-11.
- [155] Rye, C.; Withers, S.G. »Glycosidase mechanisms« *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 573-580.
- [156] Withers, S.G. »Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases« *Carbohydr. Polym.* **2001**, *44(4)*, 325-337.
- [157] Osborn, H.M.I.; Khan, T.H. »Recent developments in polymer supported synthesis of oligosaccharides and glycopeptides« *Tetrahedron* **1999**, *55*, 1807-1850.
- [158] Andrade, R.B.; Plante, O.J.; Melean, L.G.; Seeberger, P.H. »Solid-phase oligosaccharide synthesis preparation of complex structures using a novel linker and different glycosylating agents« *Org. Lett.* **1999**, *1(11)*, 1811-1814.
- [159] Knerr, L.; Schmidt, R.R. »Application of a ring closing metathesis based linker to the solid phase synthesis of oligosaccharides« *Synlett* **1999**, 1802-1804.
- [160] Jenniches, B. »Kombinatorische Synthese von Glycopeptidmimetika« Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, **2000**; pp. 199.

-
- [161] Brooks, L.A.; Snyder, H.R. »4-Penten-1-ol« *Org. Synth. Coll.* **1955**, 3, 698-700.
- [162] Nishida, Y.; Thiem, J. »Unexpected formation of a 4,6-*O*-propylidene derivative from galactose and allyl alcohol in the presence of amberlyst^R15« *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, 13(7), 1059-1063.
- [163] Rodebauch, R.; Fraser-Raid, B. »Evidence for cyclic bromonium ion transfer in electrophilic bromination of alkenes: reaction of ω -alkenyl glycosides with aqueous N-bromosuccinimide« *Tetrahedron* **1996**, 52, 7663-7678.
- [164] Hoye, T.R.; Hanson, P.R.; Vyvyan, J.R. »A practical guide to first-order multiplet analysis in ¹H NMR spectroscopy« *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 4096-4103.
- [165] Bock, K.; Thøgersen, H. »Nuclear magnetic resonance spectroscopy in study of mono- and oligosaccharides« *Ann. Rep. NMR Spectrosc.* **1982**, 13, 1-57.
- [166] Scigelova, M.; Singh, S.; Crout, D.H.G. »Glycosidases a great synthetic tool« *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1998**, 6, 483-494.
- [167] Ooi, Y.; Hashimoto, T.; Mitsuo, N.; Satoh, T. »Enzymic formation of β -alkyl glycosides by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* and its application to the synthesis of chemically unstable cardiac glycosides« *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, 33(5), 1808-1814.
- [168] Horikoshi, T.; Haratake, A.; Ikemoto, T.; Ohta, Y.; Tanno, O.; Kitamura, N. »Effects of ethyl α -D-glucoside identified in sake on skin treatment« *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan* **1998**, 32(1), 10-16 (in japanese).
- [169] Adelhorst, K.; Björkling, F.; Godtfredsen, S.E.; Kirk, O. »Enzyme catalysed preparation of 6-*O*-acylglucopyranosides« *Synthesis* **1990**, 112-115.
- [170] Sauerbrei, B.; Thiem, J. »Galactosylation and glucosylation by use of β -galactosidase« *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33(2), 201-204.

-
- [171] Kaneko, M.; Kisa, F.; Yamada, K.; Miyamoto, T.; Higuchi, R. »Constituents of holothuroidea, 8 structure of neuritogenic active ganglioside from the sea cucumber *Stichopus japonicus*« *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 3171-3174.
- [172] Higuchi, R.; Mori, T.; Sugata, T.; Yamada, K.; Miyamoto, T. »Synthesis of simple sea cucumber ganglioside analogs« *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 3175-3178.
- [173] Bravman, T.; Mechaly, A.; Shulami, S.; Belakhov, V.; Baasov, T.; Shoham, G.; Shoham, Y. »Glutamic acid 160 is the acid-base catalyst of β -xylosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6: a family 39 glycoside hydrolase« *FEBS Lett.* **2001**, 495, 115-119.
- [174] Blanchard, J.E.; Gal, L.; He, S.; Foisy, J.; Warren, R.A.J.; Withers, S.G. »The identification of the catalytic nucleophiles of two β -galactosidases from glycoside hydrolase family 35« *Carbohydr. Res.* **2001**, 333, 7-17.
- [175] Martínez-Pardo, M.; García-Montes, P.; Martín-Lomas, M.; Sols, A. *FEBS Lett.* **1979**, 98, 99-102.
- [176] Fernández-Mayoralas, A.; Martín-Lomas, M.; Villanueva, D. »4-*O*- β -D-Galactopyranosyl-3-*O*-methyl-D-glucose: a new synthesis and applications to the evaluation of intestinal lactase« *Carbohydr. Res.* **1985**, 140, 81-91.
- [177] Yoon, J.H.; Ryu, G.H.; Finch, P.; Rhee, J.S. »Enzymatic synthesis of 3-*O*-methyl-4-*O*- β -D-galactopyranosyl-D-glucose (3-*O*-methyl-lactose); a potential agent for the assessment of intestinal lactase activity« *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, 15, 191-196.
- [178] Aragón, J.J.; Fernández-Mayoralas, A.; Jiménez-Barbero, J.; Martín-Lomas, M.; Rivera-Sagredo, A.; Villanueva, D. *Clin. Chim. Acta* **1992**, 210, 221.
- [179] Salas, J.; Salas, M.; Viñuela, E.; Sols, A. »Glucokinase of rabbit liver. Purification and properties« *J. Biol. Chem.* **1965**, 240, 1014-1018.

-
- [180] Fukase, K.; Yasukochi, T.; Suda, Y.; Yoshida, M.; Kusumoto, S. »Chemoenzymic synthesis of Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)Xyl(β)-L-Ser and Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)Xyl(β)-MU by the use of β -D-galactosidase« *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37(37), 6763-6766.
- [181] Yasukochi, T.; Fukase, K.; Kusumoto, S. »3-Nitro-2-pyridyl glycoside as donor for chemical glycosylation and its application to chemoenzymatic synthesis of oligosaccharide« *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 6591-6593.
- [182] Krishna, N.R.; Agrawal, P.K. »Molecular structure of the carbohydrate-protein linkage region fragments from connective-tissue proteoglycans« *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2000**, 56, 201-234.
- [183] Huber, R.E.; Kurz, G.; Wallenfels, K. »A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of β -galactosidase (*E. coli*) on lactose« *Biochemistry* **1976**, 15, 1994-2001.
- [184] Zimmermann, F. »Chemo-enzymatische Synthesen mit der Treansketolase aus *Escherichia coli*« Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, **1999**; pp. 213.
- [185] Kragl, U.; Gödde, A.; Wandray, C.; Kinzy, W.; Cappon, J.J.; Lugtenberg, J. »Repetitive batch as a efficient method for preparative scale enzymatic synthesis of 5-azido-neuramic acid and 15N-L-glutamic acid« *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, 4, 1193-1202.
- [186] Stemmer, W.P.C. »Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling« *Nature* **1994**, 370, 389-391.
- [187] Zhang, J.-H.; Dawes, G.; Stemmer, W.P.C. »Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening« *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 4504-4509.

-
- [188] Schülein, M. »Protein engineering of cellulases« *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1543*, 239-252.
- [189] Planas, A. »Bacterial 1,3-1,4-b-glucanases: structure, function and protein engineering« *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1543*, 361-382.
- [190] Hansson, T.; Kaper, T.; van der Oost, J.; de Vos, W.M.; Adlercreutz, P. »Improved oligosaccharide synthesis by protein engineering of β -glucosidase CelB from hyperthermophilic *Pyrococcus furiosus*« *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *73*, 204-210.
- [191] Huber, R.E.; Chivers, P.T. » β -Galactosidases of *Escherichia coli* with substitutions for Glc-461 can be activated by nucleophiles and can form β -D-galactosyl adducts« *Carbohydr. Res.* **1993**, *250*, 9-18.
- [192] Wang, Q.; Graham, R.W.; Trimbur, D.; Warren, R.A.J.; Withers, S.G. »Changing enzymatic reaction mechanisms by mutagenesis: conversion of a retaining glucosidase to an inverting enzyme« *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11594-11595.
- [193] Mackenzie, L.F.; Wang, Q.; Warren, R.A.J.; Withers, S.G. »Glycosynthases: mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis« *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5583-5584.
- [194] Mayer, C.; Jakeman, D.L.; Mah, M.; Karjala, G.; Gal, L.; Warren, R.A.J.; Withers, S.G. »Directed evolution of new glycosynthases from *Agrobacterium* β -glucosidase: a general screen to detect enzymes for oligosaccharide synthesis« *Chemistry & Biology* **2001**, *8*, 437-443.
- [195] Viladot, J.-L.; Ramon, E.; Durany, O.; Planas, A. »Probing the mechanism of *Bacillus* 1,3-1,4- β -D-glucan 4-glucanohydrolases by chemical rescue of inactive mutants at catalytically essential residues« *Biochemistry* **1998**, *37*, 11332-11342.
- [196] Fort, S.; Boyer, V.; Greffe, L.; Davies, G.J.; Moroz, O.; Christiansen, L.; Schülein, M.; Cottaz, S.; Driguez, H. »Highly efficient synthesis of β (1 \rightarrow 4)-oligo- and -poly-saccharides using a mutant cellulase« *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5429-5437.

Curriculum Vitae

Personal Information

Name	Juan Manuel Juárez Ruiz
Legal status	Married
Birth place	Puebla, Puebla
Nationality	Mexican
Birth date	March 22, 1967

Academic Formation

1983-1985	High school, Preparatoria 5 de Mayo; Tepeaca, Puebla
1985-1990	College, Study of Chemistry at the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
1991-1992	official diploma as chemist under the supervision of Dr. José Manuel Méndez Stivalet
1993-1995	Master degree (Organic Chemistry) at the Universidad Nacional Autónoma de México
1995-1997	official diploma as Master of Sciences under the supervision of Dr. José Manuel Méndez Stivalet
Since Sep., 1997	Ph.D. Studies, first at the Institute of Organic Chemistry of RWTH Aachen and then at the Institute of Organic Chemistry of Darmstadt University of Technology, under the supervision of Prof. Dr. Wolf-Dieter Fessner

Language Course *Deutsch als Fremdsprache* at the RWTH Aachen, **13.02.1998**.

Congresses

- I** Juárez Ruiz, J.M.; Fessner, W.-D. »The "Natural Strategy" for the glycosidase assisted synthesis of simple glycosides« *Poster 140 in BioTrans '99. 4TH International symposium on biocatalysis and biotransformations*, **1999**, Giardini Naxos-Taormina, Italy.
- II** Juárez Ruiz, J.M.; Fessner, W.-D. »Highly regioselective (1→4) β-galactosylation of α-benzyl-xyloside by transglycosylation« *Poster 318 in BioTrans 2001. 5TH International symposium on biocatalysis and biotransformations*, **2001**, Darmstadt, Germany.